

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Identificação de substâncias dopantes em fluidos  
biológicos de atletas por LC-MS: definição de critérios de  
identificação e avaliação da incerteza do exame**

Tânia Filipa Rodrigues Cordeiro

**Mestrado em Química**  
Especialização em Química

Dissertação orientada por:  
Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva  
Doutora Susana Martins da Luz

2019



“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin 1889-1977)



## Agradecimentos

---

A concretização de um mestrado... é um longo percurso, permeado por diversos desafios, tristezas, alegrias, ansiedade, incertezas e inúmeros percalços pelo caminho, e apesar de ser um processo definido pela persistência e dedicação de cada estudante, reúne o contributo de diversas pessoas, indispensáveis, para nos orientarem nos diversos momentos desta caminhada.

O caminho que percorrido até ao momento só foi possível com o apoio e disponibilidade de múltiplas pessoas a quem dedico especialmente este projeto de vida.

Em especial há minha família, que sempre me motivou e acreditou em mim, permitindo-me progredir, a eles agradeço a orientação, a alegria e generosidade. Estou grata por ter uma família assim.

Ao meu namorado Jorge, pelo amor, partilha, companheirismo, apoio incondicional e uma enorme compreensão durante este processo.

Aos meus orientadores, professor Ricardo Bettencourt da Silva e Dra. Susana Luz, agradeço a orientação exemplar. Pelas sugestões feitas durante a escrita e no estímulo para que este trabalho fosse feito.

E por fim e não menos importante quero agradecer ao laboratório que me acolheu, o Laboratório de Antidopagem de Lisboa (LAD), pela ajuda, motivação e disponibilização dos meios que me possibilitaram alcançar a excelência na execução das análises bem como o tratamento dos dados.

Em soma quero demonstrar o meu agradecimento a todos aqueles que, de certo modo, tornaram possível a concretização da presente dissertação.

**A todos o meu sincero e profundo OBRIGADA!**



## Sumário

---

O Laboratório de Análises de Dopagem (LAD), do Instituto Português do Desporto e da Juventude, IP, utiliza diversas metodologias analíticas para a identificação e, se necessário, quantificação de vestígios de substâncias ativas proibidas, marcadores, ou dos seus metabolitos nos fluidos biológicos. Uma parte significativa do trabalho realizado no LAD envolve a utilização de métodos analítico baseados em determinações instrumentais por cromatografia em fase líquida hifenada com espectrometria de massa.

Este trabalho envolveu a definição de critérios estatísticos e a avaliação da metodologia definida pela agência Mundial Antidoping (WADA) para a identificação de compostos por LC-MS após uma adequada preparação da amostra. Esta avaliação é sustentada numa ferramenta estatística implementada numa folha de cálculo de MS-Excel que recorre a simulações Monte Carlo de tempos de retenção e abundâncias iónicas correlacionadas para definir critérios para os parâmetros usados na identificação dos analitos. As simulações baseiam-se no desempenho experimental observado e consideram a distribuição não normal e a correlação das variáveis instrumentais consideradas.

O desempenho das identificações foi quantificado pelas taxas de verdadeiros (TP) e falsos (FP) positivos. Para determinar as FP, foram desenvolvidos modelos do ruído do sinal do espectrómetro de massa, uma vez é impossível determinar experimentalmente taxas muito baixas. As estimativas de TP e FP associadas aos diferentes parâmetros de identificação foram combinadas e apresentadas como a incerteza do exame na forma de uma razão de verosimilhanças (LR). Foi estudada a identificação de treze substâncias dopantes com diversos tipos de atividade biológica. Assim, avaliou-se o desempenho dos exames tendo em conta dois critérios de identificação diferentes: o critério estatístico desenvolvido e o critério de identificação definido pela WADA. Deu-se especial atenção às taxas de falsos negativos (FN), i.e. à probabilidade de não se identificar a presença de uma substância ( $FN = 1 - TP$ ).

Os resultados obtidos permitem comprovar que a identificação de todas as substâncias, aplicando os critérios definidos pela WADA estão associadas a baixas taxas de falsos positivos. No entanto, em diversos casos, os critérios de identificação propostos pela WADA produzem elevados FN. Desta forma, a ferramenta desenvolvida pode ser muito útil para auxiliar a utilização dos critérios de identificação regulamentados pela WADA, nomeadamente estimando a probabilidade de o resultado negativo ser falso, o que pode indicar a necessidade da realização de exames replicados ou complementares.

**Palavras-Chave:** Dopagem, Desporto, Identificação de analitos, Análise Qualitativa, Incerteza do Exame, LC-MS.

---





## Abstract

---

The Doping Analysis Laboratory (LAD) of the Portuguese Institute of Sport and Youth, IP, uses various analytical methodologies for the identification and, if necessary, quantification of traces of prohibited active substances, markers, or their metabolites in biological fluids. A significant part of the work done at LAD involves the use of analytical methods based on instrumental determinations by hyphenated liquid chromatography with mass spectrometry.

This work involved the definition of statistical criteria and the evaluation of the methodology defined by the World Anti-Doping Agency (WADA) for the identification of compounds by LC-MS after adequate sample preparation. This assessment is supported by a statistical tool implemented in an MS-Excel spreadsheet using Monte Carlo simulations of retention times and correlated ionic abundances to define criteria for the parameters used in analyte identification. The simulations are based on the observed experimental performance and consider the non-normal distribution and the correlation of the considered instrumental variables.

Identification performance was quantified by true (TP) and false (FP) positive rates. To determine the FP, mass spectrometer signal noise models have been developed, since it is impossible to experimentally determine very low rates. The estimates of TP and FP associated with the different identification parameters were combined and presented as the examination uncertainty as a likelihood ratio (LR). The identification of thirteen doping substances with various types of biological activity was studied. Thus, the performance of the exams was evaluated taking into account two different identification criteria: the developed statistical criterion and the identification criterion defined by WADA. Was paid particular attention to false negative rates (FN), i.e. to the probability of not identifying the presence of a substance ( $FN = 1 - TP$ ).

The results show that the identification of all substances by applying the criteria defined by WADA is associated with low false positive rates. However, in many cases the identification criteria proposed by WADA produce high FN. Thus, the developed tool can be very useful to assist the use of the identification criteria regulated by WADA, namely estimating the probability that the negative result is false, which may indicate the need for replicated or complementary exams.

**Keywords:** Doping, Sport, Analyte identification, Qualitative Analysis, Examination Uncertainty, LC-MS.



## Índice

---

Agradecimentos.....	V
Sumário .....	VII
Abstract .....	IX
Índice.....	XI
Índice de figuras .....	XIV
Índice de tabelas .....	XVI
Lista de Acrónimos .....	XIX
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1    Controlo de dopagem no desporto .....	3
1.1.1    Considerações gerais.....	3
1.1.2    Agência Mundial Antidopagem e os seus requisitos.....	4
1.1.3    Requisitos gerais da WADA para laboratórios de controlo de dopagem.....	5
1.1.4    Substâncias e Métodos Proibidos .....	6
1.1.5    Recolha, Receção e Conservação de amostras de controlo de dopagem.....	7
1.2    Seleção e considerações sobre as substâncias no âmbito do trabalho .....	9
1.2.1    Classes de Substâncias e Métodos Proibidos .....	9
1.2.2    Estatística a nível Mundial e Nacional.....	12
1.2.3    Classe das Substâncias a analisar .....	13
1.3    Metodologias analíticas aplicadas na análise de substâncias proibidas .....	15
1.3.1    Análises de Triagem e de Confirmação e critérios gerais aplicáveis .....	15
1.3.2    Tipo de Metodologias analíticas.....	16
1.3.3    Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massa.....	16
1.3.4    Análises por LC-MS/MS- Parâmetros de identificação de substâncias .....	18
1.3.5    Metodologias de tratamento de resultado .....	20
1.3.6    Requisitos de validação e de acreditação .....	20
1.4    Controlo da qualidade em análises qualitativas de controlo de dopagem.....	21
1.4.1    Procedimentos aplicáveis.....	21
1.4.2    Critérios de aceitação/rejeição.....	22
1.5    Avaliação da Incerteza em análises qualitativas .....	22

1.5.1	Teorema de Bayes .....	23
1.5.2	Incerteza do Exame .....	25
1.5.3	Método de Monte Carlo .....	26
1.6	Objetivo, âmbito do trabalho e entidade de acolhimento .....	27
1.6.1	Objetivo e âmbito do trabalho .....	27
1.6.2	O Laboratório de Análises de Dopagem (LAD) .....	27
Capítulo II – Parte Experimental .....		29
2.1.	Equipamento e Material.....	31
2.1.1.	Equipamentos.....	31
2.1.2.	Materiais.....	31
2.2.	Reagentes, Materiais de referência e Soluções/Misturas.....	31
2.2.1.	Reagentes .....	31
2.2.2.	Materiais de Referência .....	31
2.2.3.	Soluções e misturas .....	31
2.3.	Procedimento Experimental.....	33
2.3.1.	Preparação das amostras .....	34
2.3.2.	Extração em fase sólida .....	35
2.3.3.	Reconstituição da amostra .....	35
Capítulo III– Resultados e discussão.....		29
1.7	CrITÉRIOS simplificados de despiste da presença de analitos.....	39
1.8	Confirmação da presença de analito.....	39
1.8.1	Procedimento de confirmação definido pela WADA .....	39
1.8.2	CrITÉRIOS de aceitação de amostras positivas definidos pela WADA.....	40
1.9	Amostras biológicas em estudo .....	41
1.9.1	Substâncias pesquisadas .....	41
1.10	Processamento dos Resultados das análises de LC-MS/MS .....	45
1.11	Folha de MS-Excel para Simulações Monte Carlo .....	45
1.11.1	Definição de limites estatísticos de aceitação de resultados.....	47
3.6	Estimativa de taxas de Falsos Positivos e Falsos Negativos .....	49
3.5.3.	Razões de verosimilhança e classificação de evidências.....	52
3.5.4.	Avaliação dos critérios de identificação .....	53
Capítulo IV – Conclusão .....		60

Capítulo V – Bibliografia.....	64
Capítulo V – Anexos.....	70
Anexo 1: Limites de aceitação .....	72
Anexo 2: Diferenças de razões de abundâncias e tempos de retenção relativos entre controlo e amostras analisadas .....	74

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.1:</b> Diagrama ilustrativo de um cromatógrafo de fase líquida (LC) e os seus principais componentes. O computador e impressora não são essenciais para este tipo de determinações. Adaptado de (a cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massa 2009 .....	17
<b>Figura 1.2:</b> Etapas da conversão de moléculas na fase gasosa em fragmentos iónicos cuja abundância é representada por um espectro de massa. Adaptado de (Basics of mass spectrometry 2006). .....	18
<b>Figura 1.3:</b> Esquema da operação de um espectrómetro de massa em modo MS/MS. Adaptado do (instituto de Biologia e sistemas moleculares 2013). .....	19
<b>Figura 1.4:</b> Funcionamento do Método Monte Carlo.....	26
<b>Figura 3.1:</b> Estruturas químicas das substâncias analisadas (Estruturas obtidas com o software ChemDraw Ultra). .....	42
<b>Figura 3.2:</b> Exemplo de macro gerada pelo software informático MultiQuant 3.0.3 na qual é possível observar os sinais dos analitos pesquisados, nomeadamente as abundâncias e tempos de retenção das transições pesquisadas.....	45
<b>Figura 3.3:</b> Distribuição aproximadamente normal de d(AR) simuladas para o analito Triantereno ao nível de concentração de MRPL. As linhas contínuas e traçadas vermelhas indicam os percentis P0.5 e P99.5 ou P2.5 e P97.5 que delimitam intervalos com nível de confiança de 99 % e 95 %, respetivamente. O traço contínuo preto representa o percentil 50, P50, que é equivalente à média da diferença. ....	46
<b>Figura 3.4:</b> Taxas de Falsos Positivos, FP, representados numa escala logarítmica, referentes a identificações baseadas em diferenças de razões de abundância de fragmentos do espectro de massa, das substâncias em análise e aos dois níveis de concentração estudados (MRPL e MRPL/2), de acordo com os critérios de aceitação estatísticos (STAT) e da WADA. Os valores de FP para STAT MRPL/2 são apresentados. O gráfico de linhas pretende facilitar a visualização da informação mas não expressa qualquer tendência de valores das taxas entre analitos. ....	50
<b>Figura 3. 5:</b> Taxas de Falsos Negativos, FN ( $FN = 1 - TP$ ), representados numa escala logarítmica, referentes a identificações baseadas em diferenças de razões de abundância de fragmentos do espectro de massa, das substâncias em análise e aos dois níveis de concentração estudados (MRPL e MRPL/2), de acordo com os critérios de aceitação estatísticos (STAT) e da WADA (WADA). Os valores de FN para WADA MRPL/2 são apresentados. O gráfico de linhas pretende facilitar a visualização da informação, mas não expressa qualquer tendência de valores das taxas entre analitos. ....	51
<b>Figura 3.6:</b> Variação das Taxas de Falsos Negativos, FN ( $FN = 1 - TP$ ), representados numa escala logarítmica, referentes a identificações baseadas em diferenças de tempos de retenção relativos, das substâncias em análise e aos dois níveis de concentração estudados (MRPL e MRPL/2), de acordo com os critérios de aceitação estatísticos (STAT) e da WADA (WADA). Os valores de FN para WADA MRPL/2 são apresentados. O gráfico de linhas pretende facilitar a visualização da informação mas não expressa qualquer tendência de valores das taxas entre analitos.....	52

**Figura 3.7:** Representação gráfica das razões de verosimilhança sob a forma Log (LR) para os vários analitos aos dois níveis de concentração estudados, obtidas para critério de identificação definido pela WADA para a confirmação de analitos. O gráfico de linhas pretende facilitar a visualização da informação, mas não expressa qualquer tendência de valores das taxas entre analitos. .... 53

## Índice de tabelas

---

<b>Tabela 1.1:</b> Lista de substâncias e métodos proibidos da Agência Mundial Antidopagem (WADA) de 2019.....	11
<b>Tabela 1.2:</b> Número de resultados analíticos positivos, por substâncias proibidas, em amostras biológicas de praticantes desportivos relatados pela ADOP de 2017. ....	12
<b>Tabela 1.3:</b> Número de resultados analíticos positivos (AAF) por classe de substâncias proibidas e métodos proibidos, encontradas em amostras analisadas no ano de 2017, pelos laboratórios acreditados pela WADA. Estes resultados positivos não devem ser confundidos com violação anti-dopagem uma vez que podem estar contidos casos de exceções de uso terapêutico. ....	13
<b>Tabela 1.4:</b> Correspondência entre o valor de razão de verosimilhança e a qualidade da evidência que suporta o resultado na forma de “Equivalente verbal” (Association of Forensic Science Providers)...	25
<b>Tabela 2.1</b> Programa de gradiente da triagem A .....	34
<b>Tabela 3.1:</b> Intervalo de aceitação de abundâncias relativas das transições definida pela WADA no documento técnico [25]. ....	41
<b>Tabela 3.2:</b> Classe de substâncias e respectivos metabolitos pesquisados como indicado pela WADA. ....	42
<b>Tabela 3.3:</b> Razão massa/carga do íon precursor ( $m/z$ ), tempos de retenção (RT), energia de colisão (CE) e modo de ionização para os vários analitos pesquisados. [49].....	43
<b>Tabela 3.4:</b> Níveis de concentração das substâncias pesquisadas fortificadas na urina analisada (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015a). ....	44
<b>Tabela 3.5:</b> Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL. ....	48
<b>Tabela 3.6:</b> Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL/2. ....	49
<b>Tabela 6.1:</b> Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL. ....	72
<b>Tabela 6.2:</b> Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL/2. ....	73



**Tabela 6.3:** Diferenças de razões de abundância de iões,  $d(AR)$ , entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Os valores a negrito e a sublinhado encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente. .... 74

**Tabela 6.4:** Diferenças de razões de abundância de iões,  $d(AR)$ , entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL/2. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente. .... 75

**Tabela 6.5:** Diferenças de tempos de retenção relativos,  $d(RRT)$ , entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL/2. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação ..... 76

**Tabela 6.6:** Diferenças de tempos de retenção relativos,  $d(RRT)$ , entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente. .... 77



## Lista de Acrónimos

---

AAF– Resultado analítico adverso (*Adverse Analytical Findings*)

ADOP - Autoridade antidopagem de Portugal

WADA – Agência Mundial Antidopagem

API – Ionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*)

APCI – Ionização Química por pressão atmosférica

EQAS – Programa de avaliação externa da qualidade (*External Quality Assessment Scheme*)

EPO – Eritropoetina

ESI – Ionização por electrospray (*Electrospray Ionization*)

FN – Taxa de Falso Negativos (*False negatives rate*)

FP–Taxa de Falsos Positivos (*False positives rate*)

GC – Cromatografia em fase gasosa

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

ILAC – Acreditação de Laboratórios Internacionais (*International Laboratory Accreditation*)

IPQ – Instituto Português da Qualidade

IPDJ – Instituto Português do Desporto e Juventude, I.P

ISTI – Norma Internacional para Ensaios e Investigações

ISTUE – Norma Internacional para Exceções de Uso Terapêutico

ISL – Norma Internacional para Laboratórios (*International Standard for Laboratories*)

ISPPi – Norma Internacional para Proteção de Privacidade e Informação Pessoal

IUPAC -União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LAD – Laboratório de Análises Antidopagem

LC – Cromatografia em fase líquida

LC/MS – Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massa

MMC – Método de Monte Carlo

MRLP – Nível mínimo de desempenho requerido (*Minimum Required Performance Level*)

MS – Espectrometria de massa (Mass Spectrometry)

MS/MS – Espectrômetro de massa em tandem

$m/z$  – Razão massa carga

PDF – Funções de densidade de probabilidade (*probability distribution functions*)

PMA – ProgrWADA Mundial Antidopagem

RT – Tempo de retenção (*Retention time*)

RTT- Tempo de retenção relativo

SIM – Monitorização de iões selecionados (*Single Ion Monitoring*)

SMC – Simulação de Monte Carlo

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE- Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extration*)

SRM - Monitorização de reação seletiva (*Selected Reaction Monitoring*)

TP – Verdadeiros Positivos (*True Positive*)

TN – Verdadeiros Negativos (*True Negative*)

VIM- Vocabulário Internacional de Metrologia



## Capítulo 1 - Introdução

---



## 1.1 Controlo de dopagem no desporto

### 1.1.1 Considerações gerais

O orgulho e a vontade incontrolável de ganhar uma competição, alcançar um novo recorde ou ser reconhecido e prestigiado, bem como as vantagens financeiras que advêm das vitórias, levam a que alguns atletas ignorem as regras desportivas, e os princípios morais e éticos que orientam as competições.

A dopagem que corresponde à utilização de substâncias ou de métodos cuja ação permite melhorar (artificialmente) o seu rendimento em competições desportivas, mesmo que tal apresente efeitos prejudiciais para a saúde dos atletas, constitui uma grande preocupação no desporto. Estes procedimentos conduzem a uma desigualdade, injustiça, desonestidade e parcialidade no mundo do desporto, violando o lema da Agência Mundial Antidopagem: “Play True”. Se não forem desmascarados, são beneficiados os infratores em detrimento daqueles que “jogam limpo”.

O risco de sanção, caso se deparem com controlos de dopagem positiva, não demovem alguns dos atletas, de recorrer a meios ilícitos que representem vantagens na competição, podendo existir, também, pressões por parte de terceiros que tenham interesses na vitória.

As primeiras menções à dopagem remontam ao século III a.C., mais concretamente à Grécia antiga, onde os atletas faziam uso de vinho, cogumelos alucinogénicos, sementes e outros materiais para melhorarem o seu desempenho. A título de exemplo, certas plantas seriam utilizadas para melhorar a velocidade e a resistência dos atletas enquanto outras ajudariam a mascarar a dor, permitindo que os atletas lesionados continuassem a competir [2].

Nas primeiras edições dos jogos olímpicos da era Moderna, a dopagem era algo raro, mas não ilegal, tendo como substância dopante mais usada uma mistura constituída por cocaína e cafeína. Até ao início do controlo médico em 1968, era possível o uso de anfetaminas e, posteriormente à Segunda Guerra Mundial, esteroides anabólicos [3].

Na atualidade, uma das formas mais formais mais comuns deste tipo de fraude é a dopagem sanguínea. Esta caracteriza-se pela administração de glóbulos vermelhos, por transfusão, ou de eritropoietina com o objetivo de estimular artificialmente a formação destes glóbulos. Ao aumentar o número de glóbulos vermelhos no sangue, aumenta a capacidade do corpo fornecer oxigénio aos músculos e também o seu rendimento. Este tipo de doping também ajuda a reduzir a sensação de esforço durante o exercício em particular a elevadas temperaturas ou altitudes.

O recurso à dopagem sanguínea é mais habitual nos atletas de desportos aeróbios (como o futebol, ciclismo e rugby). Com a criação da WADA foram feitos vários progressos e otimizações nos métodos de deteção de doping, definindo-se a proibição de certos métodos/substâncias enumeradas numa Lista de Substâncias e Métodos Proibidos da WADA.



### 1.1.2 Agência Mundial Antidopagem e os seus requisitos

A WADA é uma agência internacional, independente e não judicial, que foi criada em 1999 para estabelecer um conjunto de normas, aplicáveis a todos os desportos e diversos países, com vista a combater a dopagem no desporto a nível global. Para este combate, a WADA, delineou e desenvolveu o Programa Mundial Antidopagem (PMA) que tem como objetivo preservar os valores intrínsecos e característicos do desporto. Este programa garante que as regras antidopagem são iguais nos países e federações internacionais que reconhecem as atribuições WADA, ou seja, qualquer praticante desportivo que seja controlado num destes países será submetido ao mesmo tipo de procedimentos e, em caso de violação de uma norma antidopagem, incorre em sanções idênticas.

O PMA está formalizado em 3 níveis de documentos e procedimentos: o Código Mundial Antidopagem (nível 1), as Normas Internacionais (nível 2) e os Modelos de Boas Práticas e Linhas de Orientação (nível 3). O Código e as Normas internacionais são de aplicação obrigatória para todos os signatários do Código, já os Modelos de Boas Práticas têm a sua aplicação recomendada pela WADA, não sendo estes obrigatórios.

Um dos marcos mais significativo na luta contra a dopagem no desporto foi a criação e implementação do Código Mundial Antidopagem. Neste código encontram-se as normas e regulamentos antidopagem estabelecidos entre as diferentes organizações desportivas e as autoridades públicas competentes. O código descreve a deteção, punição e prevenção da dopagem, com vista a proteger a saúde, e promover a justiça e a igualdade entre os atletas de todo o mundo.

O segundo nível documental obrigatório é constituído por seis normas internacionais destinadas a harmonizar diferentes áreas da luta contra a dopagem no desporto [4].

As seis normas internacionais são:

- ✓ Lista de substâncias e Métodos Proibidos: Esta lista identifica as substâncias e métodos proibidos, dentro e fora da competição, por desporto específico.
- ✓ ***International Standard for Testing and Investigations (ISTI)***: Esta norma tem como objetivo a manutenção da integridade e identidade das amostras recolhidas desde o momento da recolha até à chegada ao laboratório [5].
- ✓ ***Internacional Standard for Laboratories (ISL)***: Esta norma garante a elaboração e emissão dos resultados de ensaio válidos e harmonizados, aplicados aos laboratórios acreditados pela WADA. Fazem parte integrante do ISL, os Technical Documents, Technical Letters e Guidelines também de cumprimento obrigatório [6].
- ✓ ***International Standard for the Protection of Privacy and Personal Information (ISPPPI)***: Esta norma garante a proteção de dados e da privacidade de todas as partes envolvidas nas análises antidopagem [7].

- ✓ ***Internacional Standard for Therapeutic Use Exemptions (ISTUE)***: Esta norma estabelece as condições para exceções de uso terapêutico, permitindo desta forma a presença de substâncias da “Lista de Substâncias e Métodos proibidos” nas amostras biológicas dos atletas em questão [8].
- ✓ ***Internacional Standard for Code signatories***: Esta norma estabelece o cumprimento de diversos requisitos legais, técnicos e operacionais definidos no código e nas normas internacionais [9].

O Código Mundial Antidopagem considera como infrações de dopagem a ocorrência de múltiplas situações para além da presença de uma substância dopante no organismo de um atleta. Desse modo, são consideradas como infrações de dopagem, entre outras, o tráfico de substâncias dopantes pelo atleta ou pelo seu pessoal de apoio, a tentativa de utilização de substâncias ou métodos dopantes e falhas nas informações relativas aos locais de treino do atleta.

A Lista de substâncias e métodos proibidos é emitida pela Agência Mundial Antidopagem, sendo publicada no seu site, pelo que está acessível a todos. Esta lista é atualizada anualmente, pela WADA.

### 1.1.3 Requisitos gerais da WADA para laboratórios de controlo de dopagem

Os laboratórios envolvidos no combate à dopagem no desporto têm de ser acreditados segundo a norma ISO/IEC 17025, o que constitui um dos requisitos do ISL Esta norma, ISO/IEC 17025, contém os requisitos gerais de competência a seguir por laboratórios de ensaio e de calibração, servindo de referência a nível internacional, para a sua acreditação. Para efeitos de acreditação, os laboratórios têm de desenvolver, implementar e manter um sistema de gestão, que inclui procedimentos organizacionais e técnicos. O cumprimento dos requisitos desta norma demonstra a competência do laboratório e capacidade para produzir resultados válidos. As políticas e critérios gerais da acreditação internacionais são definidos pela ***International Laboratory Accreditation, ILAC***.

Para além da acreditação segundo a Norma ISO/IEC 17025, gerida pelo ILAC, os laboratórios que exercem atividade de controlo de dopagem têm de estar acreditados diretamente pela WADA. Esta acreditação implica o cumprimento de requisitos adicionais aos definidos na norma ISO.

O Instituto Português de Acreditação (IPAC) é o organismo nacional de acreditação que tem como função, entre outras, avaliar o cumprimento da norma de acreditação por laboratórios de ensaios ou calibração. Esta avaliação permite verificar se o laboratório é competente para efetuar determinado serviço, incluindo o cumprimento de normas relevantes adicionais, que transmitem confiança à informação produzida. Os laboratórios acreditados são sujeitos a avaliações externas regulares realizadas por peritos nomeados pelo organismo de acreditação.

A avaliação de acreditação inicia-se com uma reunião da equipa avaliadora com os representantes do laboratório, onde são apresentados os intervenientes, o objetivo, os métodos e os critérios da mesma. De seguida, procede-se à análise do Sistema de Gestão da Qualidade onde os

membros da equipa avaliadora avaliam a competência técnica e organizacional do laboratório. Durante a avaliação são analisados todos os recursos e procedimentos usados nos ensaios, sendo frequentemente presenciado a realização das determinações. A visita da equipa avaliadora termina com uma reunião final onde esta apresenta as conclusões e resultados da avaliação [10].

O IPAC permite a acreditação de ensaios e calibrações seguindo uma de três tipologias de descrição da atividade: a descrição fixa, a descrição flexível intermédia e a descrição flexível global. Esta última divide-se em Tipo A e B que abrange a implementação de métodos normalizados ou internos, respetivamente.

A descrição fixa caracteriza-se pela identificação do analito e método de ensaio específico avaliado incluindo a edição do procedimento de ensaio. A descrição flexível intermédia permite ao laboratório implementar novas versões do método avaliado caso a nova versão apresente desempenho equivalente e necessite de competências similares à versão anterior (*i.e.*, mesmo princípio de ensaio, equipamento, validação, calibração e controlo de qualidade). A descrição flexível global tipo A permite ao laboratório implementar métodos normalizados e adicioná-los à lista de ensaios sob acreditação flexível depois destes terem sido validados de acordo com procedimento aceite pelo organismo de acreditação. A descrição flexível do tipo B permite a implementação de métodos desenvolvidos internamente ou adaptados pelo laboratório e adicioná-los à Lista de ensaios sob acreditação flexível [11].

De forma a garantir a qualidade dos resultados dos ensaios, o procedimento de análise é sujeito a uma avaliação prévia do seu desempenho; *i.e.*, a uma validação. A validação inclui um levantamento e avaliação do impacto de todas as etapas e efeitos que podem afetar o resultado da análise. As etapas de validação de um procedimento de análise dependem do tipo de ensaio, que pode ser quantitativo ou qualitativo, dos detalhes e princípios da análise, e do objetivo da mesma.

A validação de um procedimento de análise, qualitativa ou quantitativa, tem como objetivo avaliar se este é capaz de produzir resultados com uma qualidade adequada ao objetivo. Este exercício deve ser realizado depois de terem sido definidos critérios objetivo para o desempenho das análises. Os requisitos não podem ser demasiado exigentes sob pena de indicarem a realização de análises demasiado caras e/ou demoradas [12] [13].

#### **1.1.4 Substâncias e Métodos Proibidos**

A *lista de substâncias e métodos proibidos (Prohibited List)* é uma norma internacional que identifica proibições aplicáveis em fases de competição e/ou fora de competição. A introdução de uma nova substância ou método nesta lista necessita de cumprir dois dos seguintes critérios: apresentar potencial para melhorar o rendimento desportivo, a sua utilização proporcionar um risco para a saúde do atleta ou a sua utilização viola o espírito desportivo. A elaboração e publicação desta lista é da responsabilidade da WADA, apresentando uma periodicidade anual.

### **1.1.5 Recolha, Receção e Conservação de amostras de controlo de dopagem**

#### **1.1.5.1 Recolha de amostras biológicas**

Nos controlos de dopagem, recolhem-se amostras de urina ou de sangue dos praticantes desportivos, amostras essas que são submetidas a análises laboratoriais específicas. As análises são realizadas por laboratório acreditado para o efeito pela WADA, visando a deteção de substâncias e métodos proibidos previstos na “Lista de Substâncias e Métodos Proibidos”.

A seleção dos praticantes desportivos a submeter a controlo de dopagem em competição pode basear-se em sorteio, classificação na competição ou numa combinação destes critérios. Estes critérios podem variar de federação para federação. As modalidades que onde os casos de dopagem são mais frequentes são controladas com uma maior frequência.

Após a seleção do atleta, este é convocado de surpresa para se apresentar na estação de controlo de dopagem. O atleta terá de estar disponível a qualquer momento para a recolha, havendo obrigação de comunicar a sua localização. Nesta estação procede-se a recolha de amostras.

No caso da recolha de urina, deve reunir-se um volume de pelo menos 90 mL, obtido sob observação direta do técnico de amostragem. A amostra de urina recolhida é transferida para um de dois frascos, A e B, do kit de colheita de amostra onde os números de código são idênticos em ambos os frascos, tampas e contentores (quando existentes), de modo a assegurar a confidencialidade da identificação dos atletas nos laboratórios que as analisam. A amostra A é utilizada na primeira análise da urina, sendo a alíquota a utilizar no imediato conservada a 4 °C e o remanescente a -20 °C. A amostra B é armazenada a -20 °C e utilizada para contra-análise, no caso de se reportar a presença de alguma substância proibida na primeira análise. Estas amostras devem ser armazenadas entre 120 dias a 8 anos após emissão do relatório de ensaio [14].

A recolha de amostras deve ser realizada de acordo com o programa de amostragem definido pela autoridade antidopagem nacional recorrendo para tal ao desenvolvimento de um sistema de cadeia de custódia. A cadeia de custódia é definida por um conjunto de procedimentos que visa à preservação dos resultados das análises realizadas, onde é possível documentar, em relatório próprio, a cronologia das evidências, quem foram os responsáveis pelo seu pedido, manuseamento, análise e transporte, minimizando a possibilidade de extravio, manipulação indevida, ou adulteração, com o objetivo de manter as evidências seguras e íntegras bem como de possuir o conhecimento de todos os dados sobre uma determinada amostra [15].

#### **1.1.5.2 Tipos de amostras biológicas**

No âmbito do controlo de dopagem, podem recolher-se amostras de urina ou de sangue, conforme o objetivo, sendo maior o número de amostras de urina utilizado nos controlos. A monitorização de urina apresenta diversas vantagens, começando pela sua recolha que se considera não-invasiva, o volume de amostra ser relativamente elevado o que permite análises de triagem, e posterior confirmação e quantificação do(s) analitos. Quando a concentração do analito na urina não é muito baixa e a preparação da urina permite o aumento da concentração da solução amostra, consegue-se determinar

menores dosagens de substâncias dopantes. No entanto, a principal vantagem da urina em relação ao sangue, deve-se ao facto da janela de deteção da maioria dos compostos na urina ser maior que no sangue. Por outro lado, apresenta como desvantagem a maior facilidade de fraude por obtenção de urina que não a do atleta testado[16].

O outro tipo de amostra de análise exequível é a sanguínea. A principal vantagem do sangue como amostra para análise deve-se ao facto de ser mais fácil assegurar a origem da mesma, porque recolhida por um profissional isento. Contudo, este método invasivo está associado a uma janela de deteção restrita, já que as substâncias são rapidamente metabolizadas no sangue, dependendo da sua semivida que varia de alguns minutos a algumas horas após a exposição [16].

A recolha de amostras de sangue é atualmente uma necessidade devido ao surgimento de novas formas de dopagem cujo objetivo é o aumento da concentração de hemoglobina através da administração de determinadas substâncias como, por exemplo, hormonas. Para combater estas novas formas de dopagem ou a utilização de substâncias com janelas de deteção muito curtas, a WADA criou o passaporte biológico (módulo hematológico). Este passaporte caracteriza-se por ser uma metodologia indireta de deteção de doping, uma vez que não se procura uma substância em particular, mas sim a resposta biológica a algo que tomou ou algum método de doping a que se sujeitou, como por exemplo, uma transfusão. Através da recolha periódica de amostras de sangue é delineado o perfil biológico do atleta e comparado com um perfil expectável normal em termos de hemoglobina, hematócrito e reticulócitos. Com este perfil é possível controlar determinados processos fisiológicos ao longo do tempo, permitindo assim avaliar os efeitos de doping que não é detetado através de pesquisas diretas. As colheitas de sangue deste tipo de controlo são realizadas fora dos períodos de competição, de forma estratégica, antes e após as competições. Caso o perfil hematológico do atleta sofra desvios significativos sem que exista uma razão justificável, como por exemplo operação cirúrgica ou hemorragia, o atleta pode ser punido disciplinarmente por ter recorrido à utilização de um método ou substância proibida [5]. Esta avaliação é realizada por um painel de peritos hematologistas que avaliam informação hematológica e média relevante.

Esta nova ferramenta apresenta-se como um complemento eficiente ao combate à dopagem realizada pelo controlo direto destas infrações. O controlo direto de dopagem é realizado, principalmente, nas modalidades com uma elevada componente aeróbia, nomeadamente o atletismo, canoagem, ciclismo, remo, natação e triatlo [1].

Recentemente, António Júlio Nunes et al desenvolveram uma metodologia inovadora de deteção de variações multivariadas dos perfis hematológicos dos atletas que permite uma deteção de doping com menos dados do que os necessários para o tratamento univariado correntemente realizado. Esta ferramenta também tem como novidade a ponderação da distância temporal das amostragens na interpretação das variações do perfil hematológico [17].

### **1.1.5.3 Receção e armazenamento de amostras de urina**

As amostras de urina são rececionadas pelo LAD e colocadas na Sala de Receção. No ato de receção existem diversos requisitos a cumprir. Inicialmente verifica-se se as amostras estão corretamente acondicionadas, se os frascos estão em bom estado e sem sinais de violação e se a amostra aparenta ser

normal. De seguida confirma-se se a quantidade de embalagens coincide com a mencionada na documentação que as acompanha (pertencentes à cadeia de custódia). É verificado se o código de cada frasco corresponde ao registado no respetivo formulário de controlo de dopagem. Inspecciona-se, por pesagem, se os volumes das amostras são equivalentes ao indicado no formulário. O anonimato do atleta é garantido pelo facto da informação correspondente à sua identificação não ser apresentada nos formulários rececionados no laboratório. Os laboratórios distinguem as amostras pelo código dos frascos rececionados e pelo número interno que atribuem a cada amostra. Embora o risco de troca de identidade das amostras seja baixo, se ocorrer, a consequência poderá ser muito grave. Deve, também, verificar-se a selagem dos sacos e dos frascos que se encontram no interior do saco e, por fim, deve-se realizar uma análise macroscópica das amostras (A e B), observando-se se a quantidade de amostras é suficiente e se as amostras A têm as mesmas características visuais que as amostras B, no que diz respeito à cor e outras características visuais [14].

Tendo como objetivo impedir a troca, perda ou adulteração das amostras, estas são sempre acompanhadas, como acima referido, de um documento designado cadeia de custódia. Neste documento, devem constar determinadas informações relevantes para a análise da amostra e apresentação do resultado: deve constar a indicação da administração de qualquer medicação ao atleta pois esta pode produzir resultados falsos positivos, as assinaturas dos responsáveis das análises, o formulário do controlo de dopagem relacionado com a amostra, informação relativa ao laboratório responsável pela análise que possa afetar a realização da determinação, o código da amostra (Kit de colheita) e da entidade responsável pela colheita e, por fim, informação adicional que seja relevante para a avaliação. Após a verificação da cadeia de custódia, as amostras são inseridas no sistema informático e seguem para a primeira fase da análise: a pré-triagem ou pré-análise [17].

Na fase designada no LAD como “pré-análise” é necessário avaliar alguns parâmetros físico-químicos da amostra. Nesta fase, verifica-se se os valores obtidos são compatíveis com urina humana de modo a diferenciar as amostras válidas de amostras grosseiramente adulteradas, sendo essas imediatamente descartadas. Após a pré-análise, prossegue-se para a etapa de triagem da presença de substância dopantes na urina, que permite dividir as amostras em negativas e suspeitas ou presumíveis positivas (i.e. que podem corresponder resultados positivos).

## 1.2 Seleção e considerações sobre as substâncias no âmbito do trabalho

### 1.2.1 Classes de Substâncias e Métodos Proibidos

Uma das seis normas internacionais mais relevantes para o combate da dopagem no desporto é a *Lista de substâncias e métodos proibidos*. Esta lista está sujeita a constantes alterações de modo a incluírem todas as novas formas de dopagem a ser monitorizadas pelas autoridades competentes.

Segundo o Código Mundial Antidopagem, a atualização da lista deve ser realizada consoante a necessidade e não menos do que uma vez por ano. A incorporação de novas substâncias na lista está sujeita ao cumprimento de dois dos três requisitos seguintes: ter potencial para melhorar o desempenho desportivo, constituir um potencial risco para a saúde do atleta ou envolver a violação do espírito desportivo [5].

São várias as substâncias e os métodos pertencentes à Lista de Substâncias e Métodos Proibidos, sendo que estas podem ser divididas em dez classes de acordo com a sua ação farmacológica e proibição dentro e fora de competição (**Tabela 1.1**). A partir de 2019, todas as Substâncias Proibidas serão consideradas "Substâncias Específicas" exceto as substâncias previstas nas classes **S1**, **S2**, **S4.4**, **S4.5** e **S6.A** e os Métodos Proibidos **M1**, **M2** e **M3**. [20].

**Tabela 1.1:** Lista de substâncias e métodos proibidos da Agência Mundial Antidopagem (WADA) de 2019

Classe	Subgrupo	Proibido (em competição)	
		Fora e Dentro	Dentro
<b><i>S1 – Agentes Anabolisantes</i></b>	a) Esteroides androgénicos anabolisantes; b) Outros agentes anabolisantes.	×	
<b><i>S2 – Hormonas Peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos</i></b>	a) Agonistas dos recetores de eritropoietina; b) Estabilizadores dos fatores indutores de hipoxia (HIF); c) CG e LH e os seus fatores de libertação; d) Corticotrofinas e os seus fatores de libertação; e) Hormona de crescimento (GH) e os seus fatores de libertação.	×	
<b><i>S3 - Beta-2 Agonistas</i></b>		×	
<b><i>S4- Hormonas e moduladores metabólicos</i></b>	a) Inibidores da aromatase; b) Moduladores seletivos dos recetores dos estrogénios; c) Outras substâncias anti estrogénicas; d) Agentes que impedem a activação do receptor de ativina IIB e) Moduladores metabólicos.	×	
<b><i>S5 - Diuréticos e Agentes mascarantes</i></b>		×	
<b><i>S6 – Estimulantes</i></b>	a) Estimulantes não específicos b) Estimulantes específicos		×
<b><i>S7 - Narcóticos</i></b>			×



<b>S8 - Canabinóides</b>			×
<b>S9 - Glucocorticosteróides</b>			×
<b>M1 - Manipulação do sangue e dos seus componentes</b>		×	
<b>M2 - Manipulação Química e Física</b>		×	
<b>M3 - Dopagem Genética</b>		×	
<b>P1 - Álcool</b>			×

### 1.2.2 Estatística a nível Mundial e Nacional

Para o presente estudo e devido ao grande número de substâncias e métodos proibidos, destacam-se as substâncias ou classes de substâncias e métodos proibidos com maior incidência a nível nacional ou internacional em 2017. As **Tabelas 1.2 e 1.3.** apresentam dados nacionais e de todos os laboratórios acreditados pela WADA, respetivamente.

**Tabela 1.2:** Número de resultados analíticos positivos, por substâncias proibidas, em amostras biológicas de praticantes desportivos relatados pela ADOP de 2017.

<i>Substâncias detetadas em 2017</i>	Nº de casos positivos
<i>Metanol</i>	1
<i>EPO</i>	1
<i>Efedrina</i>	2
<i>Carboxi-tetrahydrocannabinol</i>	11
<i>Furosemida</i>	10
<i>Estanozolol</i>	1
<i>Metilfenidato</i>	1
<i>Esteroides</i>	1
<i>5adiol</i>	1
<i>Metandienona</i>	2
<i>17-metil-5-androstane-3,17-diol</i>	1
<i>Dehydrochlorometiltestosterona</i>	1
<i>Tramcinolone Scetonide</i>	1
<i>Carvedilol</i>	1
<i>Terbutalina</i>	2
<i>Prednisolona</i>	1
<i>Oxandrolona</i>	1
<i>Metilprednisolona</i>	1
<i>Indapamida</i>	1
<i>Clenbuterol</i>	1
<i>Hidromorfona</i>	1

**Tabela 1.3:** Número de resultados analíticos positivos (AAF) por classe de substâncias proibidas e métodos proibidos, encontradas em amostras analisadas no ano de 2017, pelos laboratórios acreditados pela WADA. Estes resultados positivos não devem ser confundidos com violação anti-dopagem uma vez que podem estar contidos casos de exceções de uso terapêutico.

<i>Classe de Substância</i>	Número total de Ocorrências	Fração de AAF correspondendo ao total de AAF (%)
<b><i>S1- Agentes Anabolizantes</i></b>	<b>1813</b>	<b>44%</b>
<b><i>S5- Diuréticos e Agentes Mascarantes</i></b>	<b>614</b>	<b>15%</b>
<b><i>S6- Estimulantes</i></b>	<b>577</b>	<b>14%</b>
<b><i>S4- Hormonas e moduladores metabólicos</i></b>	<b>321</b>	<b>8%</b>
<b><i>S9- Glucocorticosteróides</i></b>	<b>224</b>	<b>5%</b>
<b><i>S8- Canabinóides</i></b>	<b>154</b>	<b>4%</b>
<b><i>S3-Beta-2 Agonistas</i></b>	<b>157</b>	<b>4%</b>
<b><i>S2- Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos</i></b>	<b>130</b>	<b>3%</b>
<b><i>S7- Narcóticos</i></b>	<b>73</b>	<b>2%</b>
<b><i>P2- Beta-bloqueantes</i></b>	<b>12</b>	<b>0,3%</b>
<b><i>M2- Manipulação Química e Física</i></b>	<b>1</b>	<b>0,02%</b>
<b><i>P1- Álcool</i></b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b><i>M1- Manipulado sangue e dos seus componentes</i></b>	<b>0</b>	<b>0%</b>

### 1.2.3 Classe das Substâncias a analisar

De seguida apresenta-se uma breve descrição das seguintes classes de substâncias proibidas com maior incidência no mundo da dopagem:

#### Beta-2 Agonistas (Classe S3)

Os agonistas seletivos dos  $\beta$ 2-adrenoreceptores (ou os  $\beta$ -2-agonistas) mais usualmente designados como “mitigadores” da asma ou broncodilatadores, são drogas que relaxam os músculos e “abrem” as vias respiratórias (brônquios dos pulmões) reduzindo assim os ataques de asma. São também utilizados em casos de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). Apresentam esta denominação, pois atuam nos recetores beta-2 de diversos tecidos lisos [21]. Por outro lado, estes fármacos promovem efeitos anabólicos e oxidativos no tecido adiposo, sendo assim muito utilizados pelos atletas, de forma ilícita, para aumento da massa muscular. É necessário ter em conta que alguns beta-2 agonistas podem

ser utilizados por via inalatória, pelos atletas asmáticos, desde que haja uma justificação terapêutica e as instâncias competentes sejam devidamente notificadas [22]. Este medicamento apresenta como efeitos secundários: tremor, insónia, agitação, cefaleias, náuseas, câibras e arritmias cardíacas.

#### Hormonas e moduladores metabólicos (Classe S4)

Os moduladores hormonais, e metabólicos em geral, são agentes que controlam a produção de hormonas. São utilizados por atletas porque diminuem os efeitos colaterais do uso de agentes anabólicos. Alguns destes aumentam a produção de proteína e, assim, a massa muscular. Estas hormonas/moduladores apresentam como efeitos secundários: a hipertrofia muscular e problemas cardiovasculares [23].

#### Narcóticos (Classe S7)

Um narcótico é uma droga que provoca dependência e reduz a dor, altera o sono, e pode alterar o humor ou comportamento. Na medicina, um narcótico analgésico refere-se aos opiáceos dos quais se distinguem as substâncias naturais, semi-sintéticas e sintéticas que atuam a nível farmacológico, como a morfina - o principal constituinte do ópio natural. Os opiáceos estão classificados na *Lista de substâncias e métodos proibidos* (WADA) como narcóticos. A utilização de analgésicos é frequente no desporto, principalmente entre os atletas envolvidos em desportos violentos. Estes atuam ao nível do sistema nervoso central (SNC), diminuindo a sensação de dor, permitindo levar o corpo ao limite [23].

Os narcóticos são considerados substâncias e drogas capazes de alterar o estado psíquico e físico de um individuo de várias formas, desde sono e total imobilização, até euforia e excitação.

Desta forma, os analgésicos narcóticos podem reduzir a ansiedade e melhorar o desempenho em eventos de desporto nos quais o excesso de ansiedade pode afetar de modo adverso o controlo motor, tal como o disparo de pistola ou arco. No entanto, a ausência ou a diminuição da sensação dolorosa pode levar a que um atleta menospreze uma lesão potencialmente perigosa, levando ao seu agravamento. Estas substâncias podem apresentar como efeitos secundários:

- Perda de equilíbrio e da coordenação
- Náuseas e vômitos
- Obstipação (prisão de ventre)
- Insónia e depressão
- Diminuição da capacidade de concentração
- Diminuição da frequência cardíaca
- Diminuição do ritmo respiratório com risco de paragem respiratória
- Dependência física e psíquica (habituação)

### Glucocorticosteróides (Classe S9)

Os glucocorticosteróides são compostos sintéticos ou naturais relacionados com as hormonas produzidas nas glândulas supra-renais, situadas imediatamente acima dos rins. Fisiologicamente, participam em várias regulações metabólicas, principalmente no metabolismo da glucose e dos lípidos. Estas substâncias, que suprimem o sistema imunológico, são utilizadas porque diminuem a sensação de dor e cansaço; i.e. como analgésicos. Os glucocorticosteróides também são utilizados para parar ataques de asma e processos inflamatórios; i.e. como anti-inflamatórios. Os processos inflamatórios no corpo têm como objetivo útil proteger o organismo de danos ou ferimentos dos tecidos [23].

Os glucocorticoides são essencialmente esteroides catabólicos que os atletas utilizam, de uma forma ilícita, para facilitarem a recuperação após a atividade desportiva e provocar euforia.

A administração de glucocorticosteróides, por injeção sistémica, via oral ou via rectal é proibida. A utilização destas substâncias ativas está autorizada por todas as outras vias desde que haja uma justificação terapêutica e as instâncias competentes sejam devidamente notificadas [1].

Este tipo de substância apresenta como efeitos secundários: insónia, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, atraso na cicatrização das feridas, diabetes, pirose, lesões musculares e tendinosas, osteoporose (diminuição da massa óssea) e risco de lesões ósseas, predisposição para infeções, psicoses e agressividade.

## 1.3 Metodologias analíticas aplicadas na análise de substâncias proibidas

### 1.3.1 Análises de Triagem e de Confirmação e critérios gerais aplicáveis

O número de substâncias proibidas e/ou seus metabólitos que se encontram na Lista de Substâncias e Métodos Proibidos da WADA para serem controlados, tem vindo a aumentar continuamente nos últimos anos, exigindo a adoção de metodologias analíticas adequadas, correspondentes a investimentos avultados em instrumentos analíticos.

Para determinar a presença e/ou ausência de uma substância na amostra, com o objetivo de identificação de casos de *Adverse Analytical Findings* (AAF) ou outra previstos nas normas da WADA, recorre-se a um procedimento constituído por duas fases:

- **Triagem:** corresponde a uma análise qualitativa, que permite verificar quais são as amostras negativas e detectar casos de eventuais positivo, identificando-se as amostras suspeitas.
- **Confirmação:** análise qualitativa e quantitativa (quando aplicável) que permite avaliar a presença/ausência de substância(s) alvo, numa amostra suspeita.

Para reduzir o risco de amostras suspeitas, em particular, é necessário que o método analítico correspondente à etapa de Triagem seja sensível e selectivo, como terá de o ser o método de Confirmação. Por outro lado, para reduzir a probabilidade de reportação de Falsos Negativos, os laboratórios adoptam critérios amplos (“majorados” em relação aos da confirmação), tendo como consequência produzir um maior número de amostras suspeitas.

Na monitorização de dopagem existem dois tipos de substâncias: as substâncias para as quais está e não está definido um valor máximo quantitativo (i.e. com e sem *Threshold*, respetivamente). As substâncias com *threshold* são produzidas pelo organismo sendo considerado doping quando presentes em níveis fisiológicos anormalmente altos. Para evitar falsos positivos de dopagem de compostos com *threshold*, a WADA elaborou documentos técnicos com valores aceitação definidos com base na incerteza máxima admissível da determinação. Assim o controlo de doping é mais complexo para substâncias sem *threshold* [24].

### 1.3.2 Tipo de Metodologias analíticas

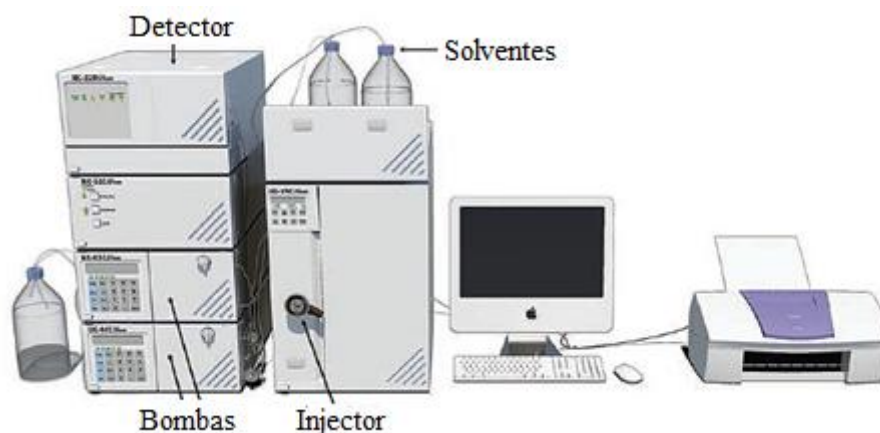
Consoante a natureza dos analitos e matrizes, e o objetivo da análise, os laboratórios de controlo de dopagem recorrem a diversas técnicas analíticas validadas, nomeadamente métodos bioquímicos e imunológicos, LC-MSn, GC-MSn e GC-C-IRMS. Os métodos cromatográficos hifenados com espectrometria de massa são usados devido à elevada sensibilidade, seletividade e flexibilidade em termos de analitos determinados do espectrómetro de massa bem como ao elevado poder de separação associado aos métodos cromatográficos usados. A WADA define procedimentos de análise que incluem critérios de identificação dos compostos com base nos tempos de retenção e abundâncias relativas dos vários fragmentos do seu espectro de massa [25].

A cromatografia caracteriza-se pela separação de determinados componentes de uma mistura por diferença de distribuição dos componentes entre uma fase móvel e uma fase estacionária. A fase móvel pode ser um líquido ou um gás, enquanto que a fase estacionária é um sólido ou um líquido. As análises cromatográficas podem-se dividir em três etapas ou processos: separação, identificação e quantificação. A separação ocorre à medida que os componentes da amostra atravessam a fase estacionária por mobilidade induzida pela fase móvel. A identificação cromatográfica é realizada através do tempo de retenção do analito de interesse observado num padrão. A quantificação é função da área do pico que, habitualmente, é diretamente proporcional à concentração desse componente na amostra. A cromatografia pode ser classificada de acordo com: a fase móvel e a fase estacionária; a natureza do processo de distribuição entre a fase móvel e estacionária, e a técnica de introdução da amostra no sistema cromatográfico. De acordo com o primeiro critério enunciado atrás, podem ser definidas duas técnicas cromatográficas: cromatografia de fase gasosa (GC) ou de fase líquida (LC) [26] [27].

### 1.3.3 Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massa

Apesar da cromatografia de fase gasosa ser uma técnica muito versátil, apresenta algumas desvantagens. A principal desvantagem da cromatografia de fase gasosa face à cromatografia de fase líquida centra-se na incapacidade de analisar componentes termicamente instáveis e pouco volatilizáveis. Só podem ser analisadas componentes termolábeis por GC após sofrerem um processo de derivação química adequado. Por esta razão, a cromatografia líquida, LC, é mais flexível que a GC nomeadamente a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Um cromatógrafo de fase líquida é constituído essencialmente por um injetor, que pode estar associado a um amostrador automático, uma bomba, uma coluna e um detetor. Neste caso, a fase móvel é líquida, sendo introduzida no sistema através de bomba. Os componentes da fase móvel, eluente, deverão ser de elevada pureza, por forma a que a própria fase móvel não seja uma fonte de interferentes. A fase móvel é aquosa ou orgânica, sendo comum a utilização de fases aquosas compostas por uma solução tampão (de fosfatos, citratos, boratos

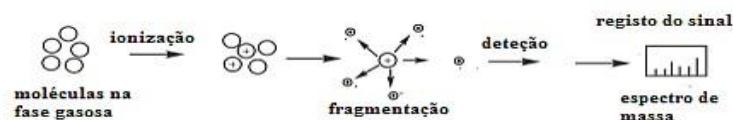
ou ácido acético) de forma a manter o pH do sistema. Os eluentes devem ser desgasificados, por exemplo por irradiação de ultrassons, de modo a retirar eventuais bolhas de ar aí presentes, passíveis de interferir na deteção ou no funcionamento da bomba.



**Figura 1.1:** Diagrama ilustrativo de um cromatógrafo de fase líquida (LC) e os seus principais componentes. O computador e impressora não são essenciais para este tipo de determinações. Adaptado de (a cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massa 2009

Como anteriormente referido, a bomba provoca a aspiração da fase móvel e a sua introdução no sistema de capilares do injetor, coluna e detetor a uma pressão elevada. Esta pressão é necessária para acelerar a eluição dos componentes da amostra através da coluna constituída por um fino enchimento. O bombeamento da fase móvel é feito, a alta pressão, por um êmbolo cujo movimento pressiona o eluente para o injetor e coluna. A amostra é introduzida no injetor por intermédio de uma microseringa e “reunida” no chamado “loop” de volume conhecido que inicialmente se encontra isolado do eluente bombeado. No tempo zero da separação cromatográfica dos componentes da amostra, o eluente é bombeado para dentro do “loop”, provocando o rápido e simultâneo arrastamento de toda a amostra para dentro da coluna. A coluna inclui no seu interior a fase estacionária sólida com partículas uniformes e de pequeno diâmetro de determinada constituição apropriada aos compostos a separar. Os componentes separados são eluídos até ao detetor que gera um sinal elétrico proporcional à concentração de analito, permitindo assim a sua quantificação. O detetor gera um cromatograma da separação, ou seja, um gráfico do sinal dado pelo detetor em função do tempo decorrido desde a injeção [27] [28].

A espectrometria de massa é um dos métodos instrumentais de análise mais flexíveis para a identificação e quantificação de compostos, fornecendo assim informação qualitativa e quantitativa acerca dos compostos analisados. Um analista experiente consegue extrair informação sobre a composição molecular e estrutura química dos compostos a partir do seu espectro de massa. Esta informação é adquirida através da presença de determinados fragmentos de grupos funcionais e do ião molecular. Este método instrumental de análise sujeita os analitos moleculares às seguintes três etapas: a ionização que envolve a conversão das moléculas em iões e a sua fragmentação em iões de menor massa, a separação dos iões de acordo com a sua razão carga/massa ( $m/z$ ) e a medição da abundância dos iões. O sinal instrumental é apresentado na forma de um espectro de massa (figura 1.2). Estes processos são realizados em vácuo para minimizar colisões com as moléculas do ar.



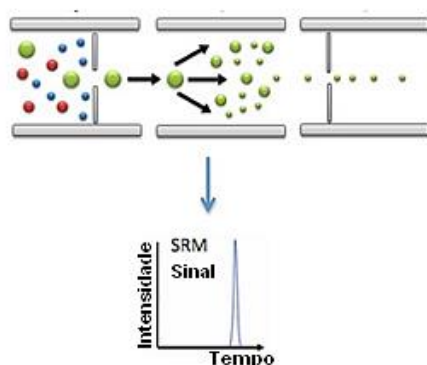
**Figura 1.2:** Etapas da conversão de moléculas na fase gasosa em fragmentos iônicos cuja abundância é representada por um espectro de massa. Adaptado de (Basics of mass spectrometry 2006).

No âmbito da aquisição de dados é utilizado um computador que recebe os sinais elétricos do detetor de massa e, através de um *software* específico, transforma esses sinais num cromatograma onde é possível conhecer a abundância relativa dos fragmentos iônicos em função da sua razão massa/carga ao longo da separação cromatográfica [29] [30].

### 1.3.4 Análises por LC-MS/MS- Parâmetros de identificação de substâncias

O detetor de massa pode operar em dois modos distintos no que respeita ao número de razões carga/massa monitorizadas. Em modo SIM (Single Ion Monitorization) ocorre a pesquisa de um número reduzido de iões com uma razão massa/carga pré-definida, sendo os restantes ignorados. Este modo de operar aumenta a sensibilidade do espectrómetro de massa, na medida em que diminui o ruído ao longo da corrida cromatográfica e aumenta a razão sinal/ruído. No modo SCAN procede-se à aquisição do espectro de massa num intervalo de razões massa/carga alargado o que diminui a sensibilidade da análise.

Neste trabalho procedeu-se a duas etapas espectrométricas consecutivas designadas como modo MS/MS ou detetor de massa em tandem. Neste procedimento, um ião precursor com determinada razão massa/carga é isolado e fragmentado dando origem a um ou vários iões precursores “filhos”. Pode proceder-se ao isolamento de um dos iões filhos. Na Figura 1.3, encontra-se esquematizado o modo de aquisição MS/MS. Este modo de aquisição pode ser entendido como uma variante do modo SIM focada na fragmentação de um fragmento do analito. O modo MS/MS é utilizado para a deteção de analitos específicos, com propriedades de fragmentação conhecidas e em amostras complexas, sendo o par ião precursor e ião fragmento chamado de transição. Assim sendo, com este detetor, vamos obter duas transições iónicas. Este modo é mais seletivo do que o estudo de apenas uma etapa de fragmentação [31].



**Figura 1.3:** Esquema da operação de um espectrômetro de massa em modo MS/MS. Adaptado do (instituto de Biologia e sistemas moleculares 2013).

No cromatograma, o tempo de retenção do analito identifica o composto analisado permitindo uma análise qualitativa, e a área do pico indica a quantidade desse composto na amostra analisada permitindo uma análise quantitativa.

Relativamente à quantificação, recorre-se sempre à comparação do sinal da amostra desconhecida com o sinal de um ou vários padrões. No caso de uma calibração com padrão externo, os sinais e valores dos padrões são usados para construção de uma função calibração: modelo de variação do sinal com o valor do padrão. Quando a repetibilidade da introdução da amostra no sistema cromatográfico é baixa, recorre-se a uma calibração com sinais normalizados pelo sinal de um padrão interno adicionado às amostras e padrões à mesma concentração. Idealmente, o padrão interno deve ser uma substância estruturalmente semelhante ao analito e que não esteja presente na amostra a analisar. O padrão interno também pode ser usado para compensar variações do tempo de retenção do analito por monitorização da razão do tempo de retenção do analito e do padrão interno conhecido como tempo de retenção relativo (*RRT*).

Para identificar o analito numa amostra desconhecida, através da técnica LC-MS/MS, é necessário existir concordância entre o tempo de retenção (*RT*) ou tempo de retenção relativo (*RRT*) e a razão de abundância de fragmentos característicos do espectro de massa do analito, entre o pico de analito, observado num padrão, e o pico suspeito da amostra. A qualidade da identificação do analito com base nestes parâmetros vai depender da precisão e seletividade do sinal.

O tempo de retenção é seletivo em matrizes simples, ou seja, matrizes que não apresentam picos próximos do tempo de retenção do analito. A precisão deste parâmetro pode ser melhorada através da determinação de um tempo de retenção relativo (*RRT*) referenciado ao tempo de retenção de um padrão interno. Em relação à utilização do espectro de massa para identificação do analito, quando o ião molecular do composto está presente numa abundância adequada, este é bastante útil para a identificação do analito por ser potencialmente seletivo. Os fragmentos iónicos usados na identificação devem ser selecionados através do seu valor de razão massa/carga tendo em conta a observação de fragmentos com este valor na matriz. Uma vez que a presença de um dado ião a um dado *TR* ou *RTT* pode não ser suficientemente seletiva, são normalmente avaliadas razões de abundância entre dois fragmentos iónico característicos do analito. Assim, mesmo que duas substâncias se fragmentem nos mesmos iões, as suas proporções tendem a ser diferentes [32].



### 1.3.5 Metodologias de tratamento de resultado

Como referido acima, para uma identificação fiável de um composto é necessário avaliar, pelo menos, dois parâmetros. No entanto, no que diz respeito às razões de abundância, é necessário ter em consideração que os fragmentos mais seletivos não são abundantes o suficiente para serem usados na identificação de níveis vestigiais de analito. Assim sendo, recorre-se aos limites de deteção e quantificação para a seleção de iões usado na análise. A escolha dos iões cuja abundância é considerada para a razão de abundância relativas têm em conta critérios definidos pela WADA para valores mínimos de razão carga/massa.

Para confirmar a presença do analito na amostra desconhecida, podem considerar-se limites definidos, pela WADA, para a concordância entre os parâmetros de identificação observados na amostra e num controlo que possui o analito. O documento técnico elaborado pela WADA apresenta estes critérios. Um pico do cromatograma da amostra é considerado como podendo ser de analito se tempo de retenção relativo diferir menos que 0.5 % ou 1 % do tempo de retenção relativo observado no analito do controlo se o padrão interno for ou não for o analito isotopicamente marcado, respetivamente. Em relação às razões de abundância, os limites de concordância entre observações na amostra e controlo variam, dependendo do valor da razão de abundância, *AR*. Se a *AR* estiver compreendida nos intervalos 1 % a 25 %, 25 % a 50 % ou 50 % a 100 % consideram-se *AR* que difiram menos que 5 %, 20% da *AR* do controlo, e 10 %, respetivamente [25]

A presença do analito é considerada confirmada, de acordo com o critério definido pela WADA, se o seu tempo de retenção relativo e *AR* características forem concordantes com o observado no analito de um calibrador [25] [32]. Nalguns casos, o analito identificado também deve ser quantificado.

### 1.3.6 Requisitos de validação e de acreditação

A validação dum procedimento analítico envolve um processo de avaliação que tem como objetivo provar que o procedimento tem a capacidade de produzir resultados adequados ao objetivo da análise. Neste processo determinam-se e avaliam-se características relevantes de desempenho bem como o campo de aplicação do procedimento. Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (*VIM*) e o Vocabulário Internacional de Examinologia (*VIN*), a validação é um processo que prova que determinado procedimento de medição ou exame é adequado para o seu propósito, respetivamente [33] [35]. As medições e exames são avaliações quantitativas e qualitativas estudados pela Metrologia e Examinologia, respetivamente.

Habitualmente, para validar um procedimento de medição determinam-se as seguintes características de desempenho: linearidade e gama de trabalho, sensibilidade, seletividade, limiares analíticos (deteção e quantificação), precisão (repetibilidade e precisão intermédia), veracidade e incerteza.

A validação de procedimento de exame pode envolver a determinação de limiares analíticos (deteção ou examinação), seletividade e incerteza do exame.

O *VIM* define seletividade dum sistema de medição como “propriedade dum sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para uma ou várias mensurandas, tal que os valores de cada mensuranda sejam

independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenómeno, corpo ou substância em estudo.”

Assim, a seletividade de um procedimento de análise química caracteriza-se pela capacidade do mesmo identificar e distinguir o analito na matriz da amostra e, portanto, refere-se a procedimentos que respondem a várias entidades químicas.

A seletividade da identificação de um analito num procedimento baseada num método cromatográfico hifenado com um espectrómetro de massa pode ser conseguida quando os parâmetros de identificação “tempo de retenção” ou “tempo de retenção relativo” e “razão de abundância de iões do espectro de massa” asseguram avaliações seletivas. Habitualmente, a identificação de compostos por esta técnica envolve a apresentação sequencial, e num curto espaço de tempo, da amostra e controlo.

Esta validação é um processo dinâmico uma vez que pode ser necessário proceder-se à revalidação do procedimento sempre que algum aspeto relevante do mesmo for alterado ou quando o controlo interno da qualidade do ensaio indicar que o desempenho analítico é diferente do observado anteriormente [34].

A utilização do procedimento analítico em rotina requer a análise de ferramentas de controlo de qualidade (e.g. itens com teor conhecido de analito) em paralelo com as amostras para se avaliar se o desempenho da análise é equivalente ao observado na etapa de validação. Caso as avaliações de controlo de qualidade passem critérios definidos, considerando o desempenho observado na validação, pode-se extrapolar a conclusão da validade das medições para os ensaios de rotina.

## 1.4 Controlo da qualidade em análises qualitativas de controlo de dopagem

### 1.4.1 Procedimentos aplicáveis

Os laboratórios acreditados pela Agência Mundial Antidopagem (WADA) desempenham um papel fundamental no combate à dopagem. Esse papel depende da capacidade de fornecer dados precisos, confiáveis e comparáveis de identificação e medição da presença de substâncias e métodos proibidos.

Para assegurar a credibilidade e confiança de um laboratório é necessário existir um controlo da qualidade. Este controlo define-se como toda a ação sistemática de modo assegurar que os seus resultados reflitam, de uma forma fidedigna e consistente, os resultados das análises e assegurar que a sua determinação não sofreu qualquer interferência.

Para tal, deve-se aplicar metodologias de controlo, nomeadamente programas de controlo de qualidade, que permitam identificar, prever e corrigir possíveis falhas e, assim, minimizar as suas consequências. Para alcançar a exigência pretendida, os laboratórios implementam dois tipos de controlo da qualidade:

- O controlo interno consiste na análise diária de brancos, replicados ou amostras de controlo, cujos valores são conhecidos e definidos no laboratório, avaliando assim a precisão e veracidade dos ensaios.

- Como não estão disponíveis materiais de referência certificados para análise de doping, o controlo externo consiste num controlo interlaboratorial onde o resultado de cada parâmetro realizado no laboratório é comparado com uma média consensual obtida a partir dos laboratórios participantes que utilizam a mesma metodologia ou outro tipo de valor de referência. Fazem então a comparação do resultado do laboratório com valor de referência avaliando assim a exatidão do resultado.

Os laboratórios de combate à dopagem acreditados participam do programa *External Quality Assessment Scheme (EQAS)* da WADA, que permite avaliar e melhorar o desempenho do laboratório, em conformidade com os requisitos da Norma Internacional para Laboratórios e Documentos Técnicos relacionados [46][47].

#### 1.4.2 Critérios de aceitação/rejeição

Nas avaliações quantitativas da presença de uma substância dopante ou de um dos seus metabolitos, o comportamento químico ou físico não ideal do sistema de medição, por vezes, produz erros sistemáticos e aleatórios relevantes nos resultados. O erro sistemático define-se como uma componente do erro, que no decorrer de uma análise, da mesma grandeza, permanece constante ou varia de uma forma previsível. O erro aleatório resulta de repetidas variações imprevisíveis que influenciam o resultado da mesma grandeza. Nenhuma análise é isenta de erros, e estes podem ter origem em diversos fatores presentes no processo de medição.

Numa análise qualitativa, podem ocorrer dois tipos de erros relacionados com a classificação incorreta do item analisado: um falso positivo (FP) ou um falso negativo (FN). O falso positivo surge quando efetivamente o analito não está presente na amostra, mas são observadas evidências que indicam a sua presença. Por outro lado, o falso negativo ocorre quando estamos perante a presença do analito na amostra, mas não são observadas evidências da sua presença. A fiabilidade da análise pode ser controlada através da graduação da evidência como forte ou fraca. Essa distinção é conseguida através da determinação da incerteza do exame por meio das taxas de resultados falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN) que se relacionam com as taxas dos verdadeiros positivos (TP) e verdadeiros negativos (TN) ( $1 = TP + FN$ ;  $1 = TN + FP$ ) [36] [37].

### 1.5 Avaliação da Incerteza em análises qualitativas

O termo incerteza e erro são frequentemente associados, tendo como consequência uma avaliação potencialmente incorreta do item analisado. Em análises quantitativas, i.e. medições, o erro é definido como a diferença entre o valor medidos e o valor verdadeiro ou de referência da grandeza medida. O erro de medição tem uma componente aleatória (erro aleatório) e, habitualmente, também uma componente sistemática (erro sistemático). Se o erro sistemático for conhecido, este pode ser usado na correção do resultado. A palavra “incerteza” significa dúvida, e assim, “incerteza de medição” significa dúvida acerca do valor medido. O VIM define incerteza de medição como “Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensuranda, com base nas informações utilizadas.”

A avaliação da incerteza de uma medição requer que o analista esteja atento a todas as fontes possíveis de incerteza. Normalmente, um estudo preliminar do processo de medição permite identificar as fontes de incerteza mais relevantes e desprezáveis para a qualidade da medição. A quantificação da incerteza do resultado de uma medição é fundamental, na medida em que permite controlar o risco de interpretações erradas da informação analítica [38] [39].

A avaliação da qualidade de análises qualitativas baseia-se na determinação de parâmetros de desempenho como a taxa de resultados falsos positivos, a taxa de resultados falsos negativos, e métricas dependentes das primeiras como a razão de verossimilhança, seletividade qualitativa e probabilidade de o resultado estar correto. Deste modo, numa análise qualitativa a incerteza assume uma forma probabilística e não a forma de um intervalo de valores associado a um nível de confiança como nas medições.

Relativamente à descrição e avaliação do desempenho de análises qualitativas podem ser usadas diversas estratégias, métodos e ferramentas estatísticas. As tabelas de contingência e o teorema de Bayes são exemplos de ferramentas que se podem aplicar neste caso.

De acordo com alguns autores, o teorema de Bayes é a teoria estatística mais adequada para avaliar e expressar a qualidade de um exame devido à sua versatilidade, capacidade de combinação de taxas de verdadeiros positivos (TP) e os falsos positivos (FP) numa única métrica, capacidade de avaliar o efeito combinado de evidências independentes. Na área forense, este teorema é frequentemente utilizado para quantificar a incerteza de um exame [36] [40] [43]

### 1.5.1 Teorema de Bayes

O teorema de Bayes tem vindo a ser muito utilizado em diversos campos da ciência, em particular nas últimas décadas, devido à sua versatilidade. Este teorema é de aplicação mais simples para estudar, expressar e atualizar probabilidades de respostas dicotómicas. O teorema permite o cálculo de probabilidades condicionais referentes a um evento (e.g. presença de analito) através da incorporação de informações de eventos anteriores, calculado assim a probabilidade à posteriori do resultado do exame estar correto. No entanto, apresenta como desvantagens alguma complexidade de terminologia e princípios, e a dificuldade de quantificação de algumas taxas de respostas falsas [40].

O teorema de Bayes pode ser apresentado na forma da **Equação 1.1**:

$$P(A/T) = \frac{P(T/A) \times P(A)}{P(T/A) \times P(A) + P(T/\neg A) \times P(\neg A)} = \frac{P(T/A) \times P(A)}{P(T)} \quad \text{Equação 1.1}$$

Sendo que  $A$  representa a situação/evento em estudo (por exemplo, a presença do analito na amostra);  $\neg A$  representa a ausência do evento;  $T$  representa a evidência do evento (por exemplo, parâmetros do LC-MS/MS que sugerem a presença do analito);  $P(A)$  e  $P(\neg A)$  representam a probabilidade do evento ou ausência de evento, respetivamente, mesmo antes da recolha de evidências específicas por análise do item estudado;  $P(T)$  representa a probabilidade da evidência do evento;  $P(A/T)$  representa a probabilidade condicional do evento dado a observação da respetiva evidência, e  $P(T/A)$  e

$P(T/\neg A)$  representam a probabilidade de se observar ou não observar, respetivamente, a evidência perante/dado o evento (Gondim 2011).

A  $P(A/T)$  pode ser considerada a incerteza do resultado do exame e  $P(T/A)$  o nível de confiança associado ao procedimento analítico.

Na **Equação 1.1**, um termo de difícil quantificação é a probabilidade à priori,  $P(A)$ , porque facilmente esta não é aplicável ao caso novo em estudo. Devido a esta dificuldade, pode-se usar o teorema sem considerar qualquer conhecimento à priori (Equação 1.2.).

$$\frac{P(T/A)}{P(T)} = \frac{P(T/A)}{P(T/A)+P(T/\neg A)} = \frac{TP}{TP+FP} \quad \text{Equação 1.2}$$

Sendo que  $P(T/A)$  e  $P(T/\neg A)$  representam a probabilidade de se observar a evidência do evento quando o evento ocorre e não ocorre, também conhecida como taxa de verdadeiros (TP) e falsos positivos (FP), respetivamente. A razão  $(P(T/A))/(P(T))$  representa a proporção de verdadeiros positivos considerando todos os resultados positivos (Bettencourt da Silva, 2016).

A probabilidade de ocorrência de um evento pode ser quantificada na forma de distribuição,  $O$  (do inglês odds). A distribuição é uma métrica é muito usada nas apostas desportivas calculada pela razão entre a probabilidade de se ganhar ou perder uma aposta. Esta distribuição é designada como distribuição à priori (**Equação 1.3**).

$$O(A) = \frac{P(A)}{P(\neg A)} \quad \text{Equação 1.3}$$

Uma distribuição,  $O(A)$ , pode ser convertida numa probabilidade,  $P(A)$ , por meio da **Equação 1.4**

$$P(A) = \frac{O(A)}{O(A)+1} \quad \text{Equação 1.4}$$

A razão entre TP e FP constitui a chamada razão de verosimilhança (**LR=TP/FP**). Esta razão quantifica quantas vezes um resultado positivo é mais provável correto do que errado.

A LR e  $O(A)$  combina-se na chamada distribuição à posteriori,  $O(A/T)$ , que também se pode calcular a partir de  $P(A/T)$ , **Equação 1.5** [32] [40].

$$\begin{aligned} O(A/T) &= \frac{P(A/T)}{P(A/T)+1} = \frac{P(A) \times P(T/A)}{P(\neg A) \times P(T/\neg A)} = \\ &= O(A) \frac{P(T/A)}{P(T/\neg A)} = O(A) \times \frac{TP}{FP} = O(A) \times LR \end{aligned} \quad \text{Equação 1.5}$$

Uma das características mais útil das distribuições é a forma como se calcula a distribuição associada a resultados determinados por evidências independentes do mesmo evento a partir de múltiplas distribuições associadas a cada evento; ou seja, por exemplo, nos casos em que a identificação do analito na amostra está dependente da observação de  $n$  evidências ( $T_1 + T_2 + \dots + T_n$ ) independentes. Neste caso, a distribuição a posteriori do resultado produzido pelas diversas evidências é determinado pelo produtório de várias distribuições, **Equação 1.6**.

$$O(A/T_1, T_2 \dots T_N) = O(A/\sum T_i) = O(A) \times \prod (LR)_i \quad \text{Equação 1.6}$$

Sendo que  $T_i$  representa a evidência independente  $i$  e  $LR$  a razão de verossimilhança associada a  $T_i$  ( $i = 1$  a  $n$ ). A  $LR_i$  é calculada a partir das taxas de verdadeiro positivo ( $TP_i$ ) e falso positivo ( $FP_i$ ) associadas a  $T_i$  [36].

### 1.5.2 Incerteza do Exame

Com base nos princípios do teorema de Bayes descritos anteriormente, a incerteza do exame pode ser quantificada como uma probabilidade  $P(A/T)$ , uma distribuição  $O(A|T)$  ou através da razão de verossimilhança ( $LR$ ). A razão de verossimilhança apresenta como vantagem a independência em relação ao um conhecimento à priori independentemente do resultado específico do exame. A determinação da  $LR$  tem como dificuldade do cálculo da FP de exames altamente seletivos. A qualidade da evidência de um evento e a razão de verossimilhança são proporcionais.

A razão de verossimilhança é utilizada na área forense para reportar a incerteza de alguns exames. A Association of Forensic Science Providers propôs uma tabela de classificação da qualidade de evidência de um determinado evento. Esta tabela apresenta diversos níveis de classificação, desde “evidência fraca” a “evidência extremamente forte”. A **tabela 1.4** apresenta a classificação de evidências através da correspondência entre a razão de verossimilhança ( $LR$ ) e a caracterização da qualidade da evidência [36] [41].

**Tabela 1.4:** Correspondência entre o valor de razão de verossimilhança e a qualidade da evidência que suporta o resultado na forma de “Equivalente verbal” (Association of Forensic Science Providers).

Valor da Razão de Verossimilhança	Equivalente Verbal
>1–10	Fraco apoio da hipótese
10–100	Moderado
100–1000	Moderadamente forte
1000–10,000	Forte
10,000–1,000,000	Muito forte
>1,000,000	Extremamente forte

O cálculo da incerteza do exame, utilizando o teorema de Bayes, tem como uma das etapas mais desafiadora a quantificação de taxas de resultados falso positivos (FP), uma vez que, na maioria dos casos, esta taxa é extremamente baixa o que leva a que seja necessário um elevado número de análises experimentais para que possa ser estimada de forma direta.

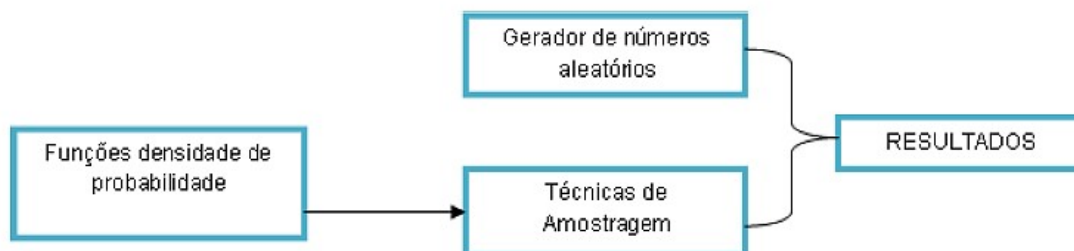
### 1.5.3 Método de Monte Carlo

Uma das formas de estimar a FP é através de simulações Monte Carlo dos sinais relevantes para constituir a evidência do evento estudado.

As rápidas evoluções dos computadores têm disponibilizado aos analistas poderosas ferramentas de cálculo, que permitem a execução da Simulação Monte Carlo (SMC) a um custo razoável e em tempos compatíveis com a dinâmica das avaliações analíticas. Este método é utilizado rotineiramente em muitos campos do conhecimento que vão desde a simulação de complexos físicos a económicos.

O método Monte Carlo, MCM, pode ser utilizado para efetuar a simulação do transporte de partículas e as suas interações com os materiais, bem como a modelação de sistemas físicos diversos como equipamentos e infraestruturas. Este método recorre a princípios fundamentais da Teoria das Probabilidades e da Estatística, de modo a simular o carácter estocástico, aleatório, das interações estudadas respeitando as leis da físico-químicas em causa.

Este método descreve o comportamento de sistemas complexos sendo modelado em termos de funções de densidade de distribuição de probabilidades (FDP). Uma vez conhecidas essas distribuições, o MMC procede à realização das simulações para cada variável aleatória, gerando-se assim diferentes resultados para a variável de saída (e.g. uma Mensuranda). Este processo é repetido diversas vezes e o resultado final caracterizado por diversos parâmetros estatísticos (e.g. média e desvio padrão) dos valores de saída [42] [43] [44].



**Figura 1.4:** Funcionamento do Método Monte Carlo.

A Simulação de Monte Carlo apresenta como vantagem a simplificação dos cálculos para os casos em que o procedimento analítico é demasiadamente complexo, pois utiliza a geração de números aleatórios para simular os valores das variáveis de entrada. A obtenção de uma aproximação da função de distribuição para a variável de saída (e.g. mensuranda) leva a que seja possível obter quaisquer parâmetros estatísticos do valor final incluindo, por exemplo, a sua incerteza. Outra vantagem deste método reside na capacidade de ser utilizado em modelos não lineares e/ou com alta complexidade. Por outro lado, apresenta como desvantagem a sua natureza computacional complexa e a variação do resultado pretendido entre análises, devido à sua natureza aleatória. É necessária uma avaliação cuidadosa da qualidade dos geradores de números pseudoaleatórios utilizados neste método.

Devido ao facto do MCM necessitar de alguns recursos computacionais, frequentemente são usados softwares que otimizam estes recursos. No entanto, é possível utilizar o MS-Excel para efetuar estas simulações se as mesmas forem em número moderado [45].

## 1.6 Objetivo, âmbito do trabalho e entidade de acolhimento

### 1.6.1 Objetivo e âmbito do trabalho

O presente trabalho foi elaborado no âmbito da unidade curricular de Dissertação, inserida no Mestrado em Química. A parte experimental do estágio foi desenvolvida no Laboratório de Análises de Dopagem (LAD), localizado em Lisboa.

### 1.6.2 O Laboratório de Análises de Dopagem (LAD)

O LAD faz parte do Instituto Português do Desporto e da Juventude, I.P. (IPDJ, I.P.) e à data do início do estágio era um dos cerca de trinta laboratórios antidopagem a nível mundial acreditados pela WADA para a realização de análises de controlo de dopagem, tendo sido acreditado pelo Comité Olímpico Internacional em 1987 e pela WADA, em 2002. O Laboratório tem capacidade para realizar análises de amostras de urina e de sangue.

A Autoridade Antidopagem de Portugal (ADOP) é responsável pela gestão do Programa Nacional Antidopagem, incluindo a colheita de amostras de fluidos de atletas, consistindo a NADO, *National Antidoping Organization*, Portuguesa.

Tanto a ADOP como o LAD podem prestar serviços às Federações, e a outros laboratórios reconhecidos pela WADA e a outras NADO.

Com vista a assegurar a qualidade das suas avaliações, o LAD adotou um Sistema de Garantia da Qualidade. Este Sistema de Gestão, que cumpre com os requisitos definidos na Norma NP/EN ISO/IEC 17025, foi avaliado pelo Organismo de Acreditação Nacional em junho de 2001, tendo sido um dos primeiros laboratórios de análises de dopagem a nível mundial a conseguir este reconhecimento externo. O LAD desenvolve ainda projetos de investigação em colaboração com outros laboratórios de análises de dopagem a nível internacional e com instituições científicas nacionais no desenvolvimento de novas metodologias analíticas no âmbito do combate à dopagem [1].





## Capítulo II – Parte Experimental

---



## 2.1. Equipamento e Material

### 2.1.1. Equipamentos

- ❖ Cromatógrafo de fase líquida, *Eksigent ultra* modelo 100, acoplado a um espectrômetro de massa *Triple Quad 5500* da ABSCIEX
- ❖ Manifold de extração em fase sólida por vácuo, *Sep-Pak*, modelo Cartridges
- ❖ Bomba de vácuo, *Life Science*
- ❖ Centrífuga, *Sigma* modelo 4-15
- ❖ Vortéx, *Heidolph* modelo M10
- ❖ Evaporador de solvente de soluções, *Caliper* modelo Turbovap LV
- ❖ Estufa, *Memmert* modelo 100-800
- ❖ Colunas de extração, *OASIS*, modelo HLB 3cc (60 mg)
- ❖ Micropipetas automáticas de 20 µL-200 µL, *Eppendorf* modelo Research
- ❖ Micropipetas automáticas de 100 µL-1000 µL, *Eppendorf* modelo Research
- ❖ Dispensador, *Eppendorf* modelo Multipette plus

### 2.1.2. Materiais

- ❖ Balões volumétricos, *Fortuna*
- ❖ Tubos cónicos e tubos de fundo redondo
- ❖ Vials de volume reduzido e tampas de rosca

## 2.2. Reagentes, Materiais de referência e Soluções/Misturas

### 2.2.1. Reagentes

O acetonitrilo LC/MS grade, a enzima  $\beta$ -Glucuronidase e o ácido fórmico p.a. foram adquiridos à *Sigma*, o metanol LC/MS grade e a água LC/MS grade foram adquiridos à *Roche*. O acetato de sódio p.a., o ácido acético glacial 99% e a água desionizada para a realização do tampão acetato de sódio foram adquiridos à *Sigma*.

### 2.2.2. Materiais de Referência

Foram preparadas soluções a uma concentração de 1000 µg/ml por diluição de uma quantidade de substância num eluente adequado. O eluente consiste numa mistura de 950 mL de solução aquosa acidificada com 50 mL de acetonitrilo.

### 2.2.3. Soluções e misturas

- ❖ Solução controlo positivo A
- ❖ System suitability\_Mix
- ❖ Solução de cortisona/hidrocortisona
- ❖ Branco de urina (BU)
- ❖ Solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e actetonitrilo (5:95, v/v) (solvente A)
- ❖ Solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e acetonitrilo (95:5, v/v) (solvente B)
- ❖ Tampão acetato de sódio a pH 5
- ❖ Mistura de solvente A e solvente B (98:2, v/v)

### 2.2.3.1. Preparação dos controles

Os controles utilizados são preparados juntamente com cada lote de análise.

#### ❖ Controlo Positivo A

Foi preparado um Controlo positivo A, para efeito específico de desenvolvimento do presente trabalho, da forma abaixo descrita.

Para um balão de 10 ml adicionou-se 4 µL de Higenamina, 40 µL de Tamoxifeno, 4 µL de Clomifeno, 61,5 µL de Meldónio, 6 µL de Prednisona, 100 µL de Hidromorfina, 4 µL de GW1516 suflóxido, 4 µL de GW1516, 4 µL de GW1516, 60 µL de 16-OH Prednisolona, 4 µL de OH-Clomifeno perfazendo o restante volume com metanol. O controlo A foi armazenado num frigorífico a – 20 °C.

#### ❖ Controlo Negativo (branco de urina e branco de água)

O branco de urina (BU) sofre o mesmo tratamento das amostras em análise. O branco de água (BA) consiste numa alíquota de água e sofre o mesmo tratamento das amostras em análise.

### 2.2.3.2. Preparação da solução mista de padrões internos

#### ❖ Mix PI's

Para um balão calibrado de 20 ml adicionou-se 40 µL formoterol-d6, 60 µL prednisolona-d8, 200 µL metiltestosterona, 200 µL efedrina-d3, 200 µL mefrusida, 2000 µL buspirona, 200 µL furosemida-d5, 20 µL testosterona-d3 e 400 µL morfina-6β-glucuronido-d3 perfazendo-se o restante volume do balão com metanol. Armazenou-se a solução a – 20 °C.

### 2.2.3.3. Preparação do controlo de hidrólise e System Suitability\_Mix

Os controles de hidrólise têm como objetivo de controlar o processo de extração e análise. O system suitability\_mix é utilizado para verificação do equipamento.

#### ❖ Controlo de hidrólise

Para um balão volumétrico de 20 mL adicionou-se 10 µL morfina-6β-glucuronido-d3, perfazendo-se o restante volume do balão com metanol. Armazenou-se a solução a – 20 °C.

❖ System Suitability Mix

Para um balão de 5 mL, adicionou-se 100 µL de 16-OH-Estanazol, 50 µL de Acetazolamida, 50 µL de Ácido Etacrínico, 50 µL de Anfetamina, 250 µL de Benzoilecgonina, 10 µL de Betametasona, 10 µL de Clenbuterol, 10 µL de Formoterol, 20 µL de Gestrinona e 100 µL de Mefrusida. De seguida, perfazeu-se o restante volume do balão com metanol. Por fim, armazenou-se a – 20 °C.

Da solução final retirou-se 50 µL, levou-se a evaporar sob corrente de azoto a 45 °C e, posteriormente, reconstituiu-se em 600 µL da composição final da fase móvel.

#### **2.2.3.4. Preparação da solução cortisona, hidrocortisona**

Adicionou-se a um balão volumétrico de 5mL determinadas quantidades de cortisona, hidrocortisona e cafeína, perfazendo-se o volume do balão com metanol. Armazenou-se a – 20 °C.

#### **2.2.3.5. Preparação dos Eluentes**

Para a preparação do eluente A (aquoso): num balão volumétrico de 1000 mL adicionou-se 1 mL de ácido fórmico e 50 mL de acetonitrilo, de seguida filtrou-se a mistura para um frasco previamente identificado e por fim colocou-se a mistura no ultrassom durante 5 min.

Para a preparação do eluente B (orgânico): num balão volumétrico de 1000 mL adicionou-se 50 mL de ácido fórmico e 950 mL de acetonitrilo, de seguida filtrou-se a mistura para um frasco previamente identificado e por fim colocou-se a mistura no ultrassom durante 5 min.

### **2.3. Procedimento Experimental**

Posteriormente à validação das amostras, após chegada ao laboratório, prossegue-se para a triagem, que permite a distinguir entre amostras negativas e amostras presumíveis positivas. O equipamento utilizado é o cromatógrafo de fase líquida da Eksigent ultra, modelo 100 acoplado ao espectrómetro de massa Triple Quad 5500 da ABSCIEX, em modo de ionização de impacto eletrónico e utilizando como analisador de massa o quadruplo, tendo em conta os requisitos expressos nos documentos técnicos da WADA.

A metodologia utilizada na triagem, prende-se pela pesquisa de substâncias pertencentes à classe de agentes anabolizantes (S1.1 e S1.2), hormonas peptídicas, fatores de crescimento e substâncias relacionadas e miméticos (S2), β2-agonistas (S3), hormonas e modeladores metabólicos (S4), diuréticos e agentes mascarantes (S5), estimulantes (S6), narcóticos (S7), canabinóides (S8), glucocorticosteróides (S9), β-bloqueantes (P1), efaproxiral (RSR13) (M1) e confounding factors (substâncias que não são detetadas se submetidas ao processo de extração e hidrólise) e outras substâncias. A triagem consiste num procedimento que se baseia numa extração em fase sólida, após hidrólise enzimática dos conjugados glucorónicos e sulfatos, seguida da análise por LC-MS em modo SRM.

Antes do processo de extração a que os controlos positivos e amostras são submetidos, é retirada uma fração de urina que é adicionada no final ao extrato resultante da extração, permitindo a análise do Etilglucuronido (confounding factor) e de outras substâncias que apresentem níveis baixos de recuperação.

As injeções foram realizadas através de um injetor sequencial em modo parcial loop fill com um volume de 5 µL.

A separação foi realizada com recurso a uma coluna capilar da XBridge modelo BEH C18, a 35°C de temperatura, 100 milímetros de comprimento, 2,1 milímetros de diâmetro interno e 2,5 µm de espessura do filme.

O modo de aquisição do espectrómetro de massa é em SRM, sendo as transições controladas de acordo com o respetivo tempo de retenção. A aquisição e tratamento dos dados foram obtidos por meio do software *MultiQuant* 3.0.3.

Ao nível da análise instrumental, a triagem divide-se em duas triagens, a triagem A e a triagem B tendo como objetivo melhorar a eficácia do varrimento e evitar a diminuição da sensibilidade. Neste trabalho apenas se efetuou a Triagem A. Na **Tabela 2.1** encontra-se programa de gradiente da triagem A.

**Tabela 2.1** Programa de gradiente da triagem A

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
0,01	0,30	95	5
0,40		95	5
2,00		80	20
5,00		70	30
11,00		5	95
12,10		5	95
12,20		95	5
17,00		95	5

### 2.3.1. Preparação das amostras

As amostras de urina, armazenadas a 4 °C, foram colocadas à temperatura ambiente e homogeneizadas. A partir de cada amostra foram preparadas quatro amostras (um branco de urina, a amostra e duas fortificações), tendo-se pipetado 2,00 mL de urina para tubos de vidro de rosca previamente identificados. Foram adicionados 100 e 50 µL de Mistura padrão aos tubos das amostras fortificadas a ½ × MRPL e MRPL de todos os analitos respetivamente. Para a realização da fracção “dilute and shoot”, transferiu-se 60 µL de cada amostra (as duas fortificações, branco de urina e a amostra) para vials onde foram de seguida armazenados a 4 °C. Fração esta que é necessária para que determinados compostos sejam detetados e analisados no equipamento. A cada uma das alíquotas foram adicionados 2,00 mL da solução tampão acetato de sódio a pH 5, 20 µL do Mix Pl's e 100 µL de β-glucoronidase. Juntamente com as amostras foi preparado um controlo positivo (CIX A) ao nível de

concentração de MRPL que sofreu o mesmo procedimento que as restantes amostras. As alíquotas foram homogeneizadas no vórtex, tapadas e colocadas a incubar na estufa a 55 °C durante duas horas, período este que é necessário para que haja hidrólise enzimática dos compostos conjugados presentes na solução.

### **2.3.2. Extração em fase sólida**

Após o período de hidrólise e arrefecimento até à temperatura ambiente, as alíquotas foram a centrifugar a 2300 r.p.m (rotações por minuto) durante 10 minutos. Durante a centrifugação das amostras, a cada coluna de extração foram adicionados 2,00 mL de metanol e 2,00 mL de tampão acetato de sódio a pH 5. Após a centrifugação das amostras, estas foram transferidas para as respetivas colunas de extração com o auxílio de pipetas de pasteur. Após a passagem das amostras pela coluna de extração procedeu-se à lavagem da coluna com 2,00 mL de água apropriada para o equipamento de LC-MS/MS. De seguida secaram-se as amostras com o auxílio de uma bomba a vácuo durante 5 min. Posteriormente foram adicionados 2,00 mL de metanol, ocorrendo a eluição das amostras. Após este processo, as amostras foram em seguida colocadas a evaporar sob corrente de azoto num banho a 45 °C até à secura ( $\pm 30$  minutos).

### **2.3.3. Reconstituição da amostra**

Os extratos secos das amostras foram reconstituídos em fase móvel (solvente A e solvente B 98:2, v/v), homogeneizadas no vórtex e colocadas a centrifugar a 2300 r.p.m (rotações por minuto) durante 5 min. Após o período de centrifugação e arrefecimento à temperatura ambiente, os extratos foram transferidos para frascos (vials) de volume reduzido com fração “*dilute and shoot*” e homogeneizados no vórtex e por fim encapsulados.





## Capítulo III– Resultados e discussão

---



## 1.7 Critérios simplificados de despiste da presença de analitos

Uma amostra pode ser considerada suspeita no que respeita à presença de analito se cumprir determinados critérios latos para o tempo de retenção ( $RT$ ) e abundância relativa de transições MS/MS seletivas considerando sinais de um calibrador com um nível de analito correspondente ao MRLP (controlo positivo). A WADA apenas define critérios para a confirmação da presença de analito, tipicamente depois de uma etapa de despiste baseada em critérios mais latos.

No que diz respeito ao tempo de retenção, a presença do composto é indicada se um dos seguintes critérios forem cumpridos:

- ❖ A diferença absoluta do  $RT$  não for superior a 0,3 minutos face ao controlo positivo;
- ❖ A diferença relativa,  $d'(RRT)$ , entre o  $RRT$  do pico suspeito presente na amostra,  $RRT(A)$ , e o  $RRT$  do controlo positivo,  $RRT(C)$ , for inferior a 6 %. A  $d'(RRT)$  é determinada de acordo com a **Equação 3.1**:

$$d'(RRT) = \frac{RRT(A) - RRT(C)}{RRT(C)} \quad \text{Equação 3.1}$$

No que diz respeito à comparação da abundância relativas,  $AR$ , das transições, a presença do composto é indicada se o seguinte critério for cumprido:

- ❖ A diferença relativa,  $d'(AR)$ , entre a razão das áreas da transição menos abundante e mais abundante observadas na amostra,  $AR(A)$ , e controlo positivo,  $AR(C)$ , deve ser menor que 60 %.

No caso das substâncias com limites quantitativos, para além dos critérios referidos anteriormente, é necessário que seja cumprido o critério da comparação quantitativa com o valor máximo de concentração de analito. Assim, uma substância com limite quantitativo só será considerada suspeita quando a concentração estimada for comprovadamente superior ao valor limite considerando um critério de decisão estabelecido pela WADA.

## 1.8 Confirmação da presença de analito

### 1.8.1 Procedimento de confirmação definido pela WADA

Após a realização da triagem, obtêm-se resultados presumíveis positivos ou negativos referentes a cada uma das amostras. Um resultado presumível positivo terá de ser confirmado através de uma técnica exata e sensível como acontece em muitos procedimentos baseados em cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa (LC/MS/MS). Por outro lado, um resultado de despiste negativo é considerado definitivo, não sendo confirmado, visto que se assume que a etapa de despiste está associada a baixas taxas de falsos negativos.

Para determinadas classes de substância pertencentes à lista de substâncias proibidas pela WADA está definido um procedimento de confirmação específico.

No que diz à confirmação semi-quantitativa da presença de glucocorticoides (**S9**) e à confirmação qualitativa dos agentes anabolizantes (**S1.1** e **S1.2**) e respetivos metabolitos, utiliza-se o LC/MS/MS Waters 2795/ Micromass Quattro micro API. As análises são efetuadas tendo em conta os critérios definidos em documentos técnicos da WADA. Neste procedimento de confirmação as urinas são submetidas a um processo de hidrólise enzimática dos conjugados glucorónicos e sulfatos, seguidamente uma extração em fase sólida e posteriormente analisadas por LC-MS/MS. No caso específico dos esteroides anabolizantes androgénicos (**S1.1**) e de algumas substâncias da classe dos glucocorticóides (**S9**), é necessária a realização prévia de uma extração em fase sólida com o objetivo de “limpar” as amostras antes do procedimento de confirmação, de forma a evitar a atividade microbiótica durante o processo de hidrólise enzimática.

No caso da confirmação qualitativa de diuréticos (**S5**), pertencente à lista de substâncias proibidas pela WADA, o equipamento a utilizar é o LCQAdvantage da *ThermoFinnigan* ou LC-MS/MS similares. As análises são efetuadas tendo em conta os critérios definidos em documentos técnicos da WADA. Neste procedimento as amostras de urina são submetidas a uma extração em fase sólida, sendo posteriormente analisadas por LC-MS/MS.

### 1.8.2 Critérios de aceitação de amostras positivas definidos pela WADA

A confirmação da presença de analito indicada pela WADA é realizada por comparação direta dos tempos de retenção ( $RT$ ) e ou tempos de retenção relativos ( $RRT$ ) e das abundâncias relativas,  $AR$ , das transições do pico suspeito da amostra e do pico de analito do controlo positivo, tendo em conta os requisitos no documento técnico da WADA [25].

A diferença absoluta do tempo de retenção (min) é determinada de acordo com a **Equação 3.2**:

$$d(RT) = RT(A) - RT(C) \quad \text{Equação 3.2}$$

Sendo que  $RT(A)$  representa o tempo de retenção do pico da amostra considerada como suspeita na triagem e  $RT(C)$  o tempo de retenção do analito no controlo.

A diferença relativa do tempo de retenção,  $d'(RT)$ , é determinada de acordo com a **Equação 3.3**.

$$d'(RT) = \frac{RT(A) - RT(C)}{RT(C)} \quad \text{Equação 3.3}$$

Uma amostra é considerada positiva se o  $d(RT)$  for inferior a 0,1 min ou se o  $d'(RT)$  for inferior a 1% e se o  $d'(RRT)$  for inferior a 1% (**Equação 3.1**)

No caso das  $AR$ , para um resultado ser considerado positivo, o pico suspeito deve cumprir os seguintes requisitos:

- ❖ Detetarem-se pelo menos duas transições;
- ❖ A abundância relativa de cada uma das transições em relação ao pico base deve ser superior a 5%;
- ❖ A razão sinal/ruído (S/N) da transição menos abundante deve ser superior a 3 ( $S/N > 3$ ).
- ❖ A diferença das abundâncias relativas,  $d(AR)$ , correspondentes ao pico suspeito da amostra e ao pico do analito no controlo positivo, para cada uma das razões consideradas, têm de estar dentro do intervalo definido na **Tabela 3.1** [25]

**Tabela 3.1:** Intervalo de aceitação de abundâncias relativas das transições definida pela WADA no documento técnico [25].

Abundância relativa (% do pico base)	Tolerância (LC/MS/MS)
50-100	$\pm 10$ % (absoluta)
25-50	$\pm 20$ % (relativa)
1-25	$\pm 5$ % (absoluta)

## 1.9 Amostras biológicas em estudo

Para a realização do trabalho foram recolhidas 35 amostras de urina pertencentes a diferentes indivíduos, de ambos os sexos, correspondentes a uma diversidade de idades de forma a ter a maior discrepância possível de matrizes. Esta discrepância de amostras prende-se com a variabilidade das urinas entre indivíduos gerada por variações do género e idade.

As alíquotas das amostras foram codificadas de forma a manter o anonimato do indivíduo e armazenadas no frigorífico a 4 °C. 30 amostras foram utilizadas na validação do procedimento de análise qualitativa e as restantes cinco amostras de urina foram usadas para uma verificação independente da metodologia desenvolvida.

As amostras de urina foram fortificadas com os analitos estudados, a dois diferentes níveis de concentração sendo eles o mínimo nível de desempenho (MRPL) e a metade do mínimo nível de desempenho ( $\frac{1}{2}$  MRPL) a partir da solução padrão de mistura cuja preparação está descrita atrás.

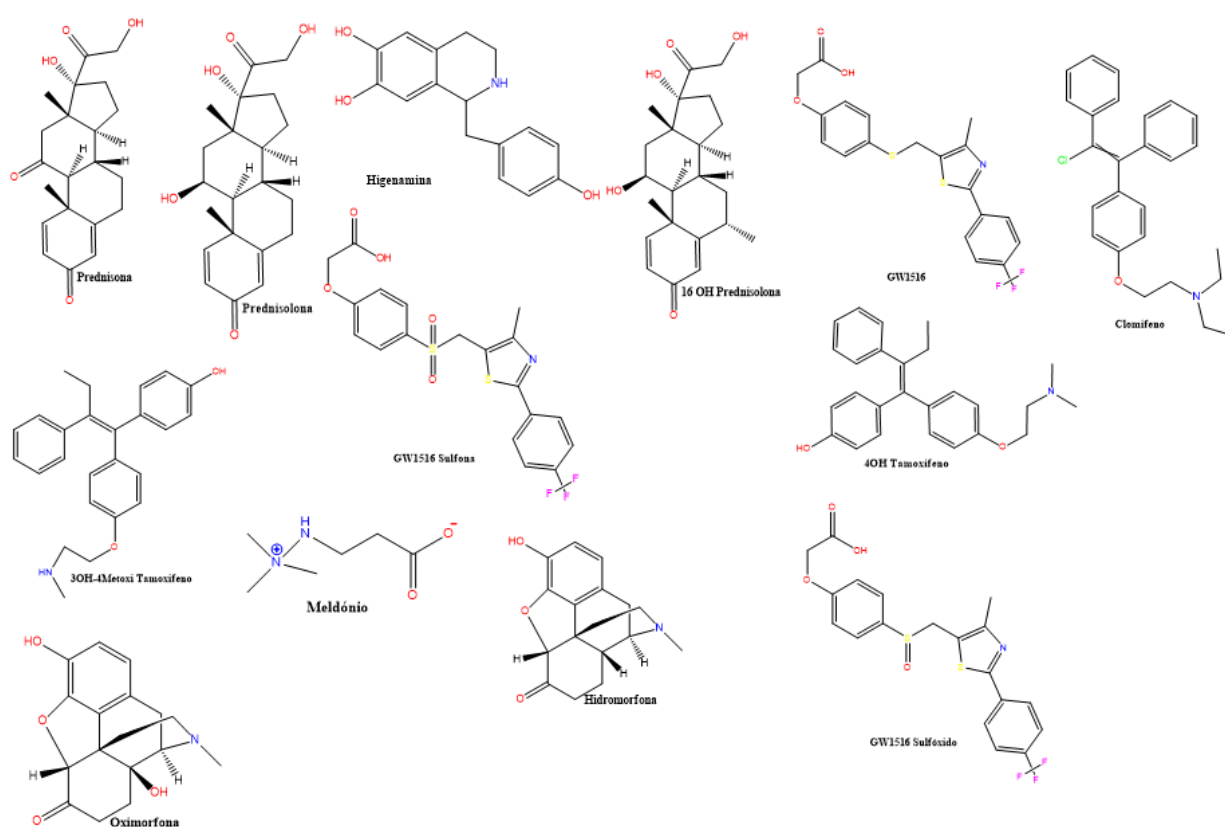
### 1.9.1 Substâncias pesquisadas

Foram pesquisadas nove substâncias dopantes e os seus respetivos metabolitos cujas as informações quanto à classe a que pertencem encontra-se resumidos na **Tabela 3.2**.

As estruturas químicas destas substâncias encontram-se representadas na **Figura 3.1**.

**Tabela 3.2:** Classe de substâncias e respectivos metabolitos pesquisados como indicado pela WADA.

Classe	Substância	Composto pesquisado
S3- Beta-2 Agonistas	Higenamina	Higenamina
S4- Hormonas e Moduladores metabólicos	Tamoxifeno	3OH Tamoxifeno 4Metoxi Tamoxifeno
	Clomifeno	Clomifeno
	Meldônio	Meldônio
	GW1516	GW1516 Sulfóxido GW1516 Sulfona GW1516
S7- Narcóticos	Hidromorfona	Hidromorfona
	Oximorfona	Oximorfona
S9- Glucocorticosteroides	Prednisolona	16 $\alpha$ OH Prednisolona Prednisolona
	Prednisona	Prednisona



**Figura 3.1:** Estruturas químicas das substâncias analisadas (Estruturas obtidas com o software ChemDraw Ultra).

Os íons precursores monitorizados, assim como valores tipo dos respetivos tempos de retenção e energia de colisão dos vários analitos encontram-se sumarizados na **Tabela 3.3**. O tempo de retenção apresentado varia com a injeção específica realizada [49].

**Tabela 3.3:** Razão massa/carga do íão precursor ( $m/z$ ), tempos de retenção ( $RT$ ), energia de colisão ( $CE$ ) e modo de ionização para os vários analitos pesquisados. [49]

Composto pesquisado	Modo de ionização	Íão precursor $m/z$ (Da)	Íões produto (Da)		CE (V)		RT (min)
			$m/z$ 1	$m/z$ 2	$m/z$ 1	$m/z$ 2	
Higenamina	Positivo	272,0	107,0	115,0	31	30	2,00
3OH 4Metoxi Tamoxifeno	Positivo	418,4	72,0	221,2	30	25	8,30
4OH Tamoxifeno	Positivo	388,0	72,1	129,0	25	31	7,92
Clomifeno	Positivo	406,2	100,1	149,1	40	40	8,67
GW1516 Sulfoxido	Positivo	470,0	256,0	257,0	35	45	8,85
GW1516 Sulfona	Positivo	486,0	257,0	272,0	30	30	9,50
GW1516	Positivo	457,4	257,0	256,0	30	30	10,90
Meldónio	Positivo	147,1	58,1	59,0	19	21	0,97
Hidromorfona	Positivo	286,3	185,0	157,0	37	51	1,46
Oximorfona	Positivo	302,2	227,0	152,1	35	75	1,47
Prednisolona	Positivo	361,3	343,3	147,1	20	30	5,88
16 $\alpha$ OH Prednisolona	Positivo	377,1	341,0	147,0	13	33	3,95
Prednisona	Positivo	359,3	147,1	237,2	25	20	5,90



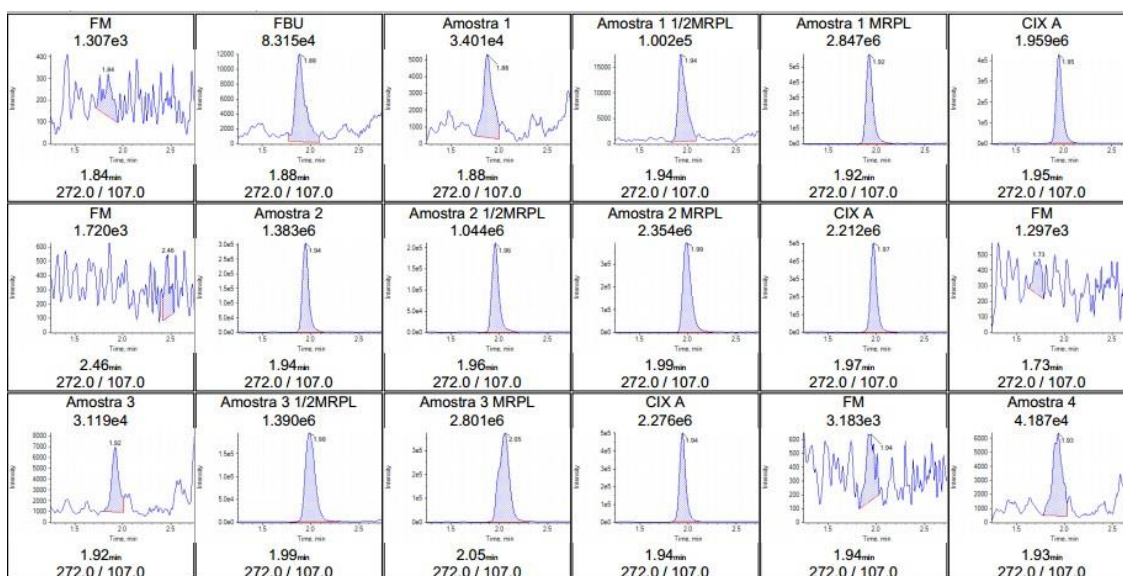
A **Tabela 3.4** apresenta as concentrações às quais as substâncias pesquisadas foram fortificadas e os respectivos limites de detecção (LOD) estimados na validação do procedimento de análise. As fortificações estão referenciadas ao MRPL definido pela WADA [25].

**Tabela 3.4:** Níveis de concentração das substâncias pesquisadas fortificadas na urina analisada (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015a).

Substância	Concentração (ng/mL)		LOD (ng/mL)
	$\frac{1}{2} \times \text{MRPL}$	MRPL	
<b>Higenamina</b>	10	20	4
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	10	20	2
<b>4OH Tamoxifeno</b>	10	20	2
<b>Clomifeno</b>	10	20	2
<b>GW1516 Sulfóxido</b>	10	20	10
<b>GW1516 Sulfona</b>	10	20	10
<b>GW1516</b>	10	20	10
<b>Meldônio</b>	100	200	200
<b>Hidromorfona</b>	25	50	5
<b>Oximorfona</b>	25	50	5
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	15	30	15
<b>Prednisolona</b>	15	30	6
<b>Prednisona</b>	15	30	6

## 1.10 Processamento dos Resultados das análises de LC-MS/MS

Os sinais instrumentais obtidos para as diferentes amostras foram tratados com recurso ao software informático *MultiQuant 3.0.3.*, tendo sido geradas macros como aquela apresentada na **Figura 3.2**. Foram recolhidas as abundâncias correspondentes a cada uma das transições iónicas dos diversos analitos, assim como os seus respetivos tempos de retenção. Juntamente com estes, foram recolhidas ainda as abundâncias e os tempos de retenção do controlo interno utilizado. Os dados foram organizados num ficheiro MS-Excel para posterior processamento.



**Figura 3.2:** Exemplo de macro gerada pelo software informático MultiQuant 3.0.3 na qual é possível observar os sinais dos analitos pesquisados, nomeadamente as abundâncias e tempos de retenção das transições pesquisadas.

Relativamente às amostras brancas, o tratamento de dados destas consistiu na integração de ruído instrumental/ruído de matriz para as transições e tempos de retenção correspondentes aos analitos pesquisados, com o objetivo de avaliar a variabilidade do sinal do branco nas matrizes analisadas. Esta informação é utilizada para estimar a taxa de falsos positivos das identificações.

## 1.11 Folha de MS-Excel para Simulações Monte Carlo

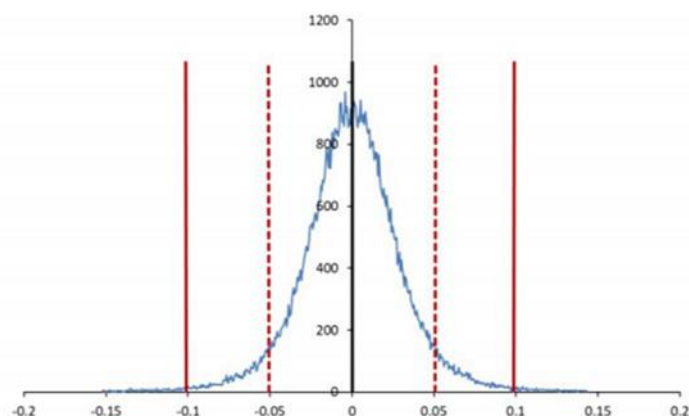
Para determinar as TP e FP de identificações de analito foram desenvolvidas duas variantes de simulações Monte Carlo numa folha de MS-Excel que correm independentemente para cada analito, concentração de analito e critério de identificação. Foram estudados de forma detalhada dois critérios distintos de identificação: (1) critérios de confirmação definidos pela WADA [24] e (2) Critério estatístico definido por modelação estatística dos sinais para um nível de confiança de 95 % (STAT) [36] Esta folha de cálculo envolve uma combinação complexa de folhas de cálculo desenvolvidas por Silva et al. [36] e Narciso et al. [37].

Para a realização dos cálculos computacionais é necessário recolher os dados relativos aos tempos de retenção e às abundâncias das transições iónicas das soluções fortificadas e calibradores. O processamento computacional dos dados, é efetuado automaticamente; ou seja, após a escolha do analito

e parâmetro a analisar (*RRT* ou *AR*) são selecionados e processados automaticamente os dados experimentais relevantes. Este processamento envolve o cálculo de parâmetros estatísticos como média, desvio padrão, coeficiente de variação, percentil específicos, e coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman de pares de variáveis. Através destes dados estatísticos são simulados 105 valores aleatórios de diferenças de tempos de retenção relativos,  $d(RRT)$ , ou de razões de abundâncias,  $d(AR)$ , entre um controlo positivo e uma amostra positiva. Os modelos de sinais desenvolvidos são posteriormente usados para determinar as TP e FP de identificações baseadas nos critérios de identificação anteriormente mencionados (WADA e STAT). Os limites de aceitação estatísticos (STAT) também são estimados por simulações de Monte Carlo.

Apesar de um grande número de parâmetros analíticos apresentarem uma distribuição aproximadamente normal, algumas variáveis de relevância analítica não têm esse tipo de distribuição, como é o caso de variáveis correlacionadas combinadas numa razão, como as *RRT* e *RA*. Nestes casos não devem ser usadas ferramentas estatísticas que assumem a normalidade dos dados. As simulações Monte Carlo de dados correlacionados são uma forma simples de modelar a distribuição não normal de *RRT*, *AR*,  $d(RRT)$  ou  $d(AR)$  [32].

Apesar de algumas *RRT* e *RA* não apresentarem uma distribuição normal, as  $d(RRT)$  e  $d(AR)$  tendem para a normalidade (Figura 3.3.) de devido à forma como a dispersão dos pares de *RRT* e *RA* se propagam numa diferença.



**Figura 3.3:** Distribuição aproximadamente normal de  $d(AR)$  simuladas para o analito Triantereno ao nível de concentração de MRPL. As linhas contínuas e traçadas vermelhas indicam os percentis P0.5 e P99.5 ou P2.5 e P97.5 que delimitam intervalos com nível de confiança de 99 % e 95 %, respetivamente. O traço contínuo preto representa o percentil 50, P50, que é equivalente à média da diferença.

Para determinar a FP é necessário recolher sinais instrumentais de matrizes sem analito das transições e nos tempos de retenção aos quais normalmente se encontrariam os analitos pesquisados. Posteriormente, procede-se à modelação do sinal da matriz através do cálculo da média e do desvio padrão do ruído observado. O modelo do sinal do ruído é definido por um intervalo construído pela média, desvio padrão e valor de *t* de Student, associado aos graus de liberdade dos primeiros parâmetros, truncado abaixo de zero (i.e. em que a densidade de probabilidade é zero abaixo sinal zero). São simulados 105 pares de abundâncias e avaliado a probabilidade do ruído produzir uma *AR* que,

juntamente com o sinal do controlo positivo, produz uma  $d(AR)$  dentro dos critérios de identificação definidos (i.e. um falso positivo, fp).

Tendo em conta que a FP aumenta exponencial à medida que baixa o teor de analito, esta foi estimada para níveis de concentração específicos (i.e. MRPL e MRPL/2). Assim, só se considera que o sinal simulado da matriz produz um fp quando os sinais de ambos os iões são superiores ao respetivo limite inferior do intervalo de confiança dos sinais para a concentração estudada e nível de confiança de 99%.

Esta simulação de sinais de matriz foi usada para avaliar FN baseados nos critérios de identificação definidos pela WADA (WADA) ou obtidos por simulação estatística (STAT). O critério da WADA só é aplicado depois de comprovar que o sinal do ião é superior a três vezes a razão sinal ruído. Desta forma, este controlo foi considerado na determinação de FP para critérios WADA.

No que respeita à determinação da FP associada à identificação de analitos com base na  $d(RRT)$ , definiu-se um valor de 1 %, por excesso, com base na experiência do analista (i.e. frequência de observação de interferentes na janela de retenção do analito). Considerou-se esta FP para identificações baseadas no critério da WADA ou modelação estatística de  $d(RRT)$ .

As TP das identificações são estimadas pela probabilidade do sinal modelado de analito cumprir os critérios de identificação. No caso da definição de limites de aceitação estatísticos, a TP coincide com o nível de confiança do limite (tipicamente 95 %). A TP das identificações com base do critério de WADA são determinadas por simulação de sinal de analito e variam com a concentração de analito.

Depois de determinadas as TP e FP, calcula-se a respetiva razão de verosimilhança das identificações de analitos que variam com o analito, concentração de analito e critério de identificação considerado.

### 1.11.1 Definição de limites estatísticos de aceitação de resultados

Para os dois níveis de concentração estudados dos diversos analitos, foram modeladas as distribuições não normais das diferenças de razões de abundância,  $d(AR)$ , e dos tempos de retenção relativos,  $d(RRT)$ , com base em simulações Monte Carlo.

Para cada uma destas distribuições foram calculados os percentis que limitam os intervalos de confiança a 95 % e 99 %. Foi igualmente calculado o percentil 50 que não coincide com a média de distribuições assimétricas. A **Tabela 3.5** e a **Tabela 3.6** do **Anexo 1** apresenta os limites de aceitação definidos para um intervalo de confiança de 95 %. Com base nos dados da tabela é possível observar que, frequentemente, ambos os parâmetros estudados apresentam uma distribuição não normal, visto que os limites não se posicionam simetricamente em torno do valor zero. É também possível observar que os limites correspondentes aos  $d(RRT)$  variam com o nível de concentração. Quanto aos limites correspondentes a  $d(AR)$ , observa-se uma redução da sua amplitude com um aumento da concentração podendo atribuir-se tal facto à dispersão dos dados recolhidos e à aleatoriedade das simulações.

**Tabela 3.5:** Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL.

Analito	d(AR)		d(TRR)	
	Min	Máx	Min	Máx
<b>Higenamina</b>	0,050	0,071	-0,047	0,039
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	-0,041	0,170	-0,025	0,025
<b>4OH Tamoxifeno</b>	-0,023	0,316	-0,023	0,029
<b>Clomifeno</b>	0,007	0,367	-0,025	0,028
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,232	0,596	-0,027	0,028
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,108	0,151	-0,028	0,028
<b>GW1516</b>	0,080	0,110	-0,032	0,033
<b>Meldónio</b>	0,377	0,568	-0,005	0,005
<b>Hidromorfona</b>	0,633	0,781	-0,022	0,027
<b>Oximorfona</b>	0,534	0,631	-0,026	0,026
<b>Prednisolona</b>	0,678	1,014	-0,148	0,144
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	0,710	0,958	-0,119	0,100
<b>Prednisona</b>	0,541	0,685	-0,147	0,149

**Tabela 3.6:** Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL/2.

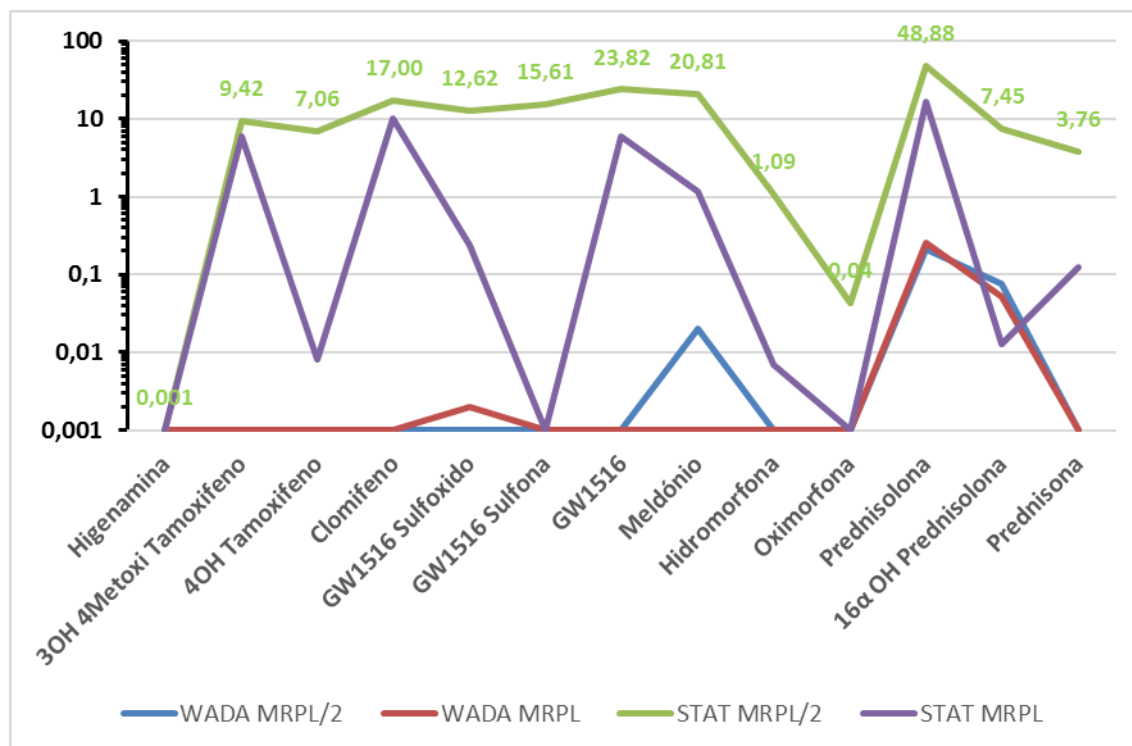
Analito	d(AR)		d(TRR)	
	Min	Máx	Min	Máx
<b>Higenamina</b>	0,046	0,093	-0,046	0,046
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	-0,031	0,223	-0,024	0,026
<b>4OH Tamoxifeno</b>	-0,151	0,508	-0,026	0,028
<b>Clomifeno</b>	-0,022	0,399	-0,026	0,028
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,188	0,679	-0,029	0,028
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,071	0,266	-0,030	0,030
<b>GW1516</b>	0,071	0,122	-0,035	0,034
<b>Meldónio</b>	0,324	0,587	-0,005	0,005
<b>Hidromorfona</b>	0,256	0,838	-0,023	0,024
<b>Oximorfona</b>	0,548	0,643	-0,026	0,023
<b>Prednisolona</b>	0,492	1,360	-0,128	0,088
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	0,614	1,124	-0,116	0,090
<b>Prednisona</b>	0,441	0,751	-0,143	0,129

Para a avaliação do desempenho dos parâmetros de identificação dos analitos, foram determinados experimentalmente 104 parâmetros de identificação, tendo em conta todos analitos, níveis de concentração, matrizes estudadas e o tipo de limite (i.e WADA e STAT). Do total das 104 avaliações realizadas observou-se que em 25 casos, que se encontram assinalados a negrito e a sublinhado nas tabelas, os valores de d(AR) que não se encontram dentro dos respetivos limites. Foi observado que a maioria desses se referem ao nível de concentração mais baixo (i.e. MRPL/2). É de destacar que se observam desvios em relação aos limites estatístico e definidos pela WADA. Estes casos poderão estar relacionados com a presença de algum interferente cromatográfico não observado nos dados usados para definir os limites estatísticos.

### 3.6 Estimativa de taxas de Falsos Positivos e Falsos Negativos

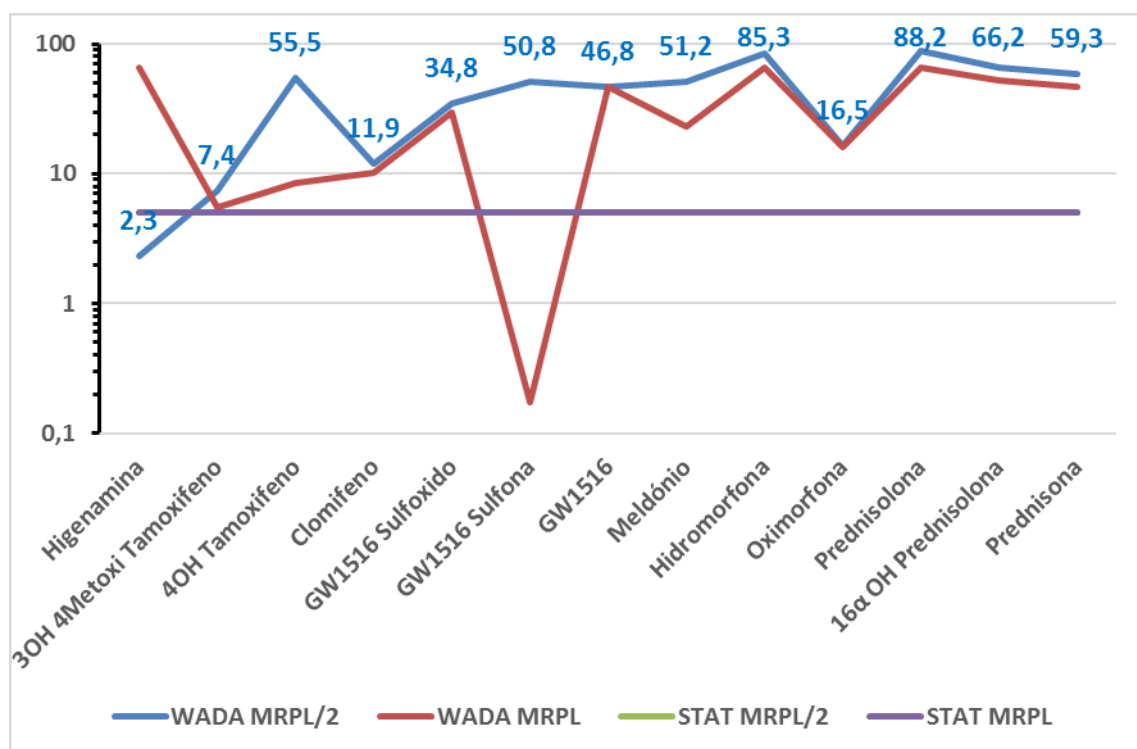
Através das simulações de Monte Carlo realizadas na folha de cálculo MS-Excel desenvolvida (i.e. não recorrendo aos dados das Tabelas 3.7 a 3.10), foram determinadas as taxas de sucesso dos critérios de aceitação estatísticos (STAT) e definidos pela WADA (WADA). Os critérios de identificação estatísticos foram definidos para um nível de confiança de 95% que estabelece a TP. As TP de identificações baseadas nos critérios definidos pela WADA foram determinadas por modelação Monte Carlo.

No que respeita à determinação da FP, assumiu-se que as identificações baseadas em  $d(RRT)$ , considerando critérios estatísticos ou definidos pela WADA, é igual a 1 %. Estima-se, com base na experiência neste tipo de análises, que existe cerca de 1 % de probabilidade de se observar um pico dentro da janela de  $d(RRT)$  do analito, que não corresponde a esse analito. A determinação de FP com base em identificações baseadas na  $d(RA)$  foi determinada por Modelação Monte Carlo como descrito atrás.



**Figura 3.4:** Taxas de Falsos Positivos, FP, representados numa escala logarítmica, referentes a identificações baseadas em diferenças de razões de abundância de fragmentos do espectro de massa, das substâncias em análise e aos dois níveis de concentração estudados (MRPL e MRPL/2), de acordo com os critérios de aceitação estatísticos (STAT) e da WADA. Os valores de FP para STAT MRPL/2 são apresentados. O gráfico de linhas pretende facilitar a visualização da informação mas não expressa qualquer tendência de valores das taxas entre analitos.

A taxa de FP de identificação de analitos recorrendo a  $d(RA)$  foi estimada para os dois níveis de concentração com recurso à folha de cálculo desenvolvida, tendo-se obtido os resultados descritos na **Figura 3.4**. Nesta figura, é possível observar que a FP é baixa quando se usam os critérios definidos pela WADA. Por outro lado, quando se usam os critérios estatísticos, nalguns casos a taxa de FP é demasiado elevada chegando a atingir 48% para a Prednisolona. Este resultado deve-se à baixa sensibilidade da determinação deste analito em que o sinal a MRPL/2 confunde-se com o sinal do branco. O critério da WADA evita a apresentação de resultados falsos positivos através da definição de intervalos de aceitação de reduzida amplitude. O revés do critério da WADA é a baixa TP, ou alta taxa de falsos negativos FN ( $FN = 1 - TP$ ), associada à utilização deste critério como será discutido de seguida.

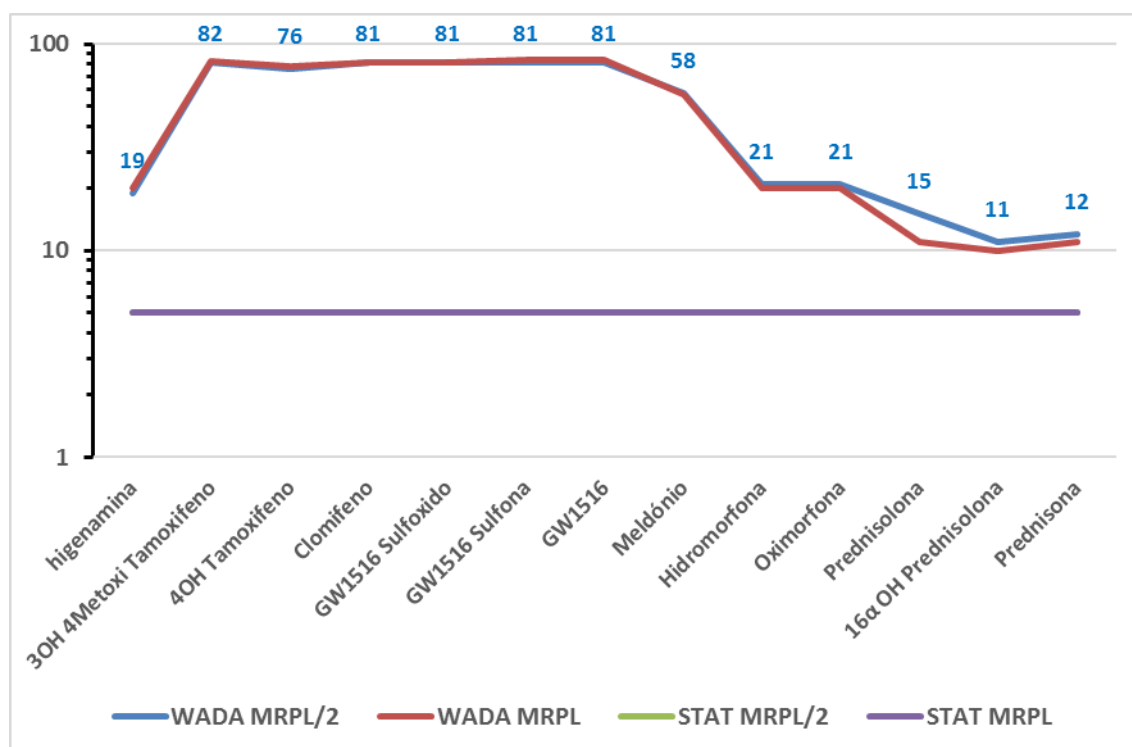


**Figura 3. 5:** Taxas de Falsos Negativos, FN ( $FN = 1 - TP$ ), representados numa escala logarítmica, referentes a identificações baseadas em diferenças de razões de abundância de fragmentos do espectro de massa, das substâncias em análise e aos dois níveis de concentração estudados (MRPL e MRPL/2), de acordo com os critérios de aceitação estatísticos (STAT) e da WADA (WADA). Os valores de FN para WADA MRPL/2 são apresentados. O gráfico de linhas pretende facilitar a visualização da informação, mas não expressa qualquer tendência de valores das taxas entre analitos.

Nos resultados obtidos para taxa de FN referentes a  $d(RA)$  (**Figura 3.5**), pode-se observar esta taxa tem um valor fixo de 5 % para identificações baseadas em critérios estatísticos. Em relação ao critério de aceitação da WADA, apenas em dois casos (Higenamina: MRPL/2 e GW1516 Sulfona: MRPL) observa-se FN inferiores a 5 %. Assim sendo, quando se usa o critério de identificação definido pela WADA, a probabilidade da presença da substância não ser identificada é frequentemente superior a 5 %.

É possível constatar, através da **Figura 3.5**, que, na generalidade dos casos e como esperado, ao nível de concentração MRPL as identificações baseadas no critério da WADA são mais fiáveis do que a MRPL/2 (menores FN). Quando se usam critérios estatísticos na identificação dos compostos, estes garantem a mesma TP e FN independentemente do nível de concentração ou desempenho da identificação.





**Figura 3.6:** Variação das Taxas de Falsos Negativos, FN ( $FN = 1 - TP$ ), representados numa escala logarítmica, referentes a identificações baseadas em diferenças de tempos de retenção relativos, das substâncias em análise e aos dois níveis de concentração estudados (MRPL e MRPL/2), de acordo com os critérios de aceitação estatísticos (STAT) e da WADA (WADA). Os valores de FN para WADA MRPL/2 são apresentados. O gráfico de linhas pretende facilitar a visualização da informação mas não expressa qualquer tendência de valores das taxas entre analitos.

A **Figura 3.6** apresenta as FN para identificações baseadas em  $d(RRT)$ . Estes resultados indicam que os critérios definidos pela WADA produzem FN surpreendentemente elevados. Tendo em conta que Narciso et al [37] demonstrou que os critérios definidos pela WADA para  $d(RRT)$  são adequados para análises por GC-MS/MS, os dados da **Figura 3.6** sugerem a necessidade de se usarem critérios mais latos para determinação por LC. É necessário reunir mais evidências experimentais da precisão dos tempos de retenção de análises por LC-MS/MS para verificar a adequação dos critérios definidos pela WADA.

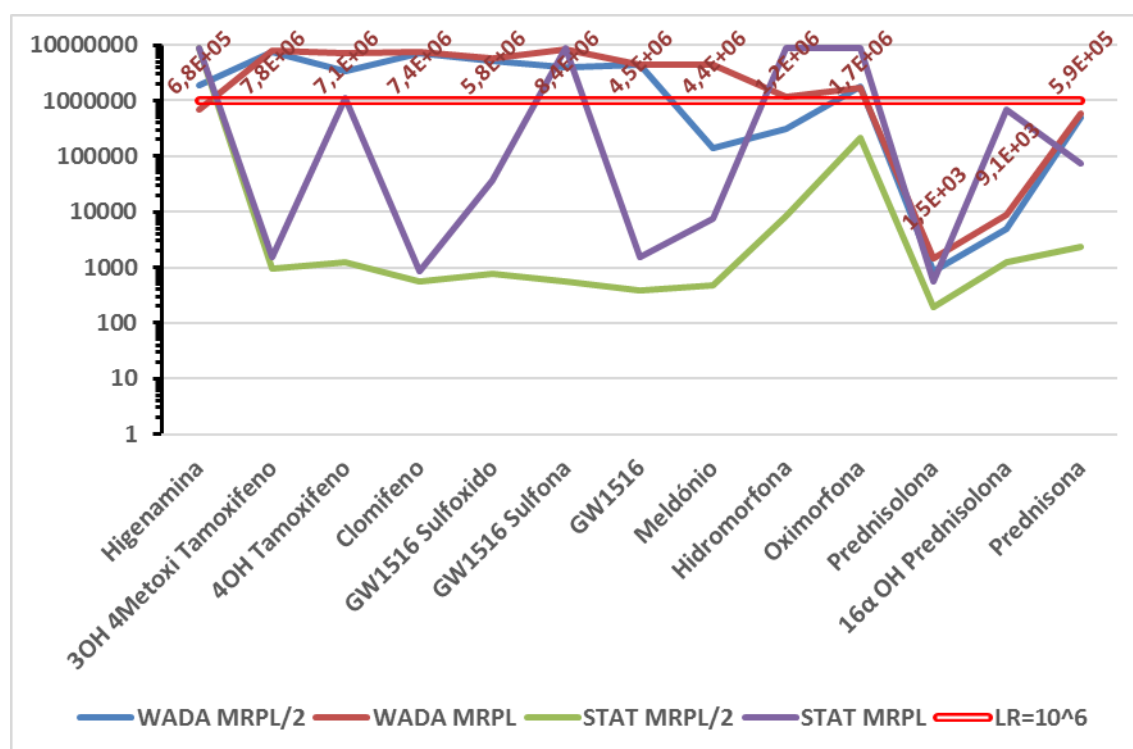
### 3.5.3. Razões de verosimilhança e classificação de evidências

Com o objetivo de comparar a qualidade dos exames dos diversos analitos em estudo usando os dois critérios de aceitação aplicados (i.e. WADA e STAT), foram calculadas as razões de verosimilhança combinadas das evidências necessárias (i.e.  $d(RRT)$  e  $d(AR)$ ) à identificação de compostos por LC-MS/MS tendo por base a **Equação 1.6**. O cálculo destas LR combinadas tem em conta os valores das taxas de TP e FP das identificações baseadas nas  $d(RA)$  e  $d(TRR)$ . De forma a facilitar a interpretação e comparação dos resultados, os valores obtidos para LR foram apresentados numa escala logarítmica. As LR também foram avaliadas considerando a classificação proposta pela UK's Association of Forensic Science Providers e apresentada na **Tabela 1.4**. De acordo com esta organização, as evidências são mais vinculativas quando  $LR \geq 10^6$ .

Da análise dos valores de LR obtidos (**Figura 3.7**) constata-se que os resultados positivos baseados em critérios da WADA são menos incertos (i.e. têm LR superiores) quando comparados com

positivos baseados nos critérios estatísticos. Tal diferença deve-se ao facto dos critérios da WADA serem mais restritos o que reduz os FP. No entanto, este desempenho está associado a altas taxas de FN. A maioria das identificações baseados nos critérios da WADA são consideradas adequadas por apresentarem um  $LR > 10^6$ .

Conclui-se assim que os critérios definidos pela WADA são demasiado otimistas relativamente ao desempenho das identificações por LC-MS/MS e os critérios estatísticos indicam a necessidade de otimização deste tipo de identificações, por exemplo, através do aumento da sensibilidade e seletividade da análise.



**Figura 3.7:** Representação gráfica das razões de verossimilhança sob a forma Log (LR) para os vários analitos aos dois níveis de concentração estudados, obtidas para critério de identificação definido pela WADA para a confirmação de analitos. O gráfico de linhas pretende facilitar a visualização da informação, mas não expressa qualquer tendência de valores das taxas entre analitos.

### 3.5.4. Avaliação dos critérios de identificação

Depois de definidos os limites de aceitação estatísticos, estes e os limites definidos pela WADA, foram testados através da análise de dez urinas fortificadas a diversos níveis de concentração de analito, independentes das consideradas na definição dos limites. Foram calculadas as  $d(RRT)$  e  $d(AR)$  entre o controlo positivo e a amostra fortificada, tendo-se obtido os valores apresentados na **Tabela 3.7**, **Tabela 3.8**, **Tabela 3.9** e **Tabela 3.10** do **Anexo 2**.

Os resultados obtidos da avaliação dos critérios de identificação estatísticos são concordantes com o nível de confiança dos limites. Uma vez que os limites de aceitação de  $d(AR)$  e  $d(TRR)$  foram definidos para um intervalo de confiança de 95 % era de esperar rejeições da ordem de 5%. A taxa de rejeição observada de 6% é equivalente ao valor de 5%.

**Tabela 3.7:** Diferenças de razões de abundância de iões,  $d(AR)$ , entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Os valores a negrito e a sublinhado encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente.

Analito	d(AR)									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
Higenamina	0,004	0,001	0,000	0,009	0,005	0,012	-0,005	-0,007	-0,008	-
3OH 4Metoxi Tamoxifeno	0,024	-0,003	-0,003	0,019	0,033	-0,023	-0,002	-0,019	-0,015	-
4OH Tamoxifeno	-0,029	0,031	-0,005	0,032	0,013	0,007	0,026	0,005	-0,015	0,012
Clomifeno	0,006	0,019	-0,003	-0,017	-0,006	-0,013	-0,021	0,024	0,007	-0,010
GW1516 Sulfoxido	0,067	<b>-0,088</b>	<b>-0,095</b>	<b>0,088</b>	-0,024	<b>-3,546</b>	-0,017	-0,009	0,016	<b>0,208</b>
GW1516 Sulfona	-0,004	0,008	0,016	-0,016	-0,003	0,014	0,002	-0,003	-0,020	-0,018
GW1516	-0,005	-0,000	-0,005	0,004	-0,001	-0,004	-0,004	-0,006	-0,002	-0,006
Meldónio	<b>-0,345</b>	<b>-0,315</b>	-0,058	0,052	<b>0,131</b>	<b>0,130</b>	-0,002	<b>-0,109</b>	-0,052	-
Hidromorfona	<b>-0,082</b>	-0,044	-0,049	-0,009	<b>-0,133</b>	<b>-0,092</b>	<b>0,099</b>	<b>-0,061</b>	-0,044	<b>-0,094</b>
Oximorfona	<b>0,062</b>	0,000	-0,027	0,021	0,028	-0,010	-0,031	0,022	0,004	-0,022
Prednisolona	-0,038	0,011	-0,002	0,012	<b>-0,118</b>	-0,031	0,000	-0,017	-0,001	0,005
16 $\alpha$ OH Prednisolona	-0,005	0,006	-0,027	<b>0,074</b>	<b>-0,119</b>	<b>-0,051</b>	0,047	<b>0,071</b>	0,017	-0,043
Prednisona	<b>-0,089</b>	<b>-0,085</b>	-0,028	-0,034	<b>-0,109</b>	-0,024	0,020	0,027	-0,035	-0,024

**Tabela 3.8:** Diferenças de razões de abundância de iões, d(AR), entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL/2. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente.

Analito	d(AR)									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
<b>Higenamina</b>	<b>0,015</b>	0,002	<b>0,008</b>	<b>0,020</b>	<b>0,017</b>	<b>0,020</b>	-0,003	0,004	0,006	-
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	0,065	-0,005	<b>0,148</b>	0,069	0,049	0,003	0,003	-0,019	-0,025	-
<b>4OH Tamoxifeno</b>	-0,019	0,026	0,048	0,079	0,022	-0,017	0,069	0,004	0,008	-0,024
<b>Clomifeno</b>	0,040	-0,006	-0,006	-0,002	0,010	-0,012	0,007	-0,009	0,008	-0,027
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	<b>-0,089</b>	-0,025	-0,029	0,053	-0,013	<u><b>-3,723</b></u>	-0,038	<b>0,082</b>	0,018	<b>0,115</b>
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,020	0,036	0,023	-0,002	-0,019	-0,006	0,007	0,001	-0,012	-0,007
<b>GW1516</b>	0,001	0,011	0,003	-0,003	-0,006	0,008	0,003	0,000	0,004	-0,006
<b>Meldónio</b>	<b>-0,227</b>	<b>-0,207</b>	-0,056	0,075	<b>0,165</b>	0,019	-0,037	-0,091	-0,096	-
<b>Hidromorfona</b>	0,013	<b>-0,183</b>	-0,015	<b>-0,076</b>	<b>-0,090</b>	<b>-0,062</b>	<b>0,102</b>	-0,010	<b>-0,075</b>	<b>-0,097</b>
<b>Oximorfona</b>	0,027	0,014	0,022	0,010	0,028	-0,033	-0,017	0,016	0,017	-0,012
<b>Prednisolona</b>	<b>-0,099</b>	<b>-0,077</b>	-0,033	<b>-0,054</b>	<b>-0,164</b>	<b>-0,097</b>	0,029	<b>-0,055</b>	-0,048	<b>-0,080</b>
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	<b>0,101</b>	<b>0,081</b>	<b>0,105</b>	<b>0,069</b>	<b>-0,120</b>	-0,036	<b>0,078</b>	-0,004	0,045	<b>-0,076</b>
<b>Prednisona</b>	<b>-0,055</b>	<b>0,066</b>	0,010	-0,011	<b>-0,076</b>	-0,043	<b>-0,099</b>	0,015	<b>-0,076</b>	-0,033

**Tabela 3.9:** Diferenças de tempos de retenção relativos,  $d(RRT)$ , entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL/2. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação

Analito	d(TRR)									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
<b>Higenamina</b>	0,000	<b>0,012</b>	0,002	<u><b>-0,048</b></u>	<b>-0,033</b>	<b>-0,029</b>	-0,005	<b>0,010</b>	<b>-0,009</b>	-
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	0,007	0,000	-0,004	0,002	-0,009	-0,003	0,000	0,004	0,000	-
<b>4OH Tamoxifeno</b>	0,007	0,000	-0,004	0,001	-0,006	0,006	-0,001	-0,002	0,006	0,006
<b>Clomifeno</b>	0,006	0,000	-0,004	0,002	-0,009	0,002	-0,003	-0,002	0,004	0,000
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,008	0,002	-0,002	0,000	-0,010	0,006	-0,004	0,000	0,004	0,000
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,009	0,000	-0,004	0,004	-0,010	0,004	-0,009	-0,002	0,004	0,000
<b>GW1516</b>	0,010	0,000	-0,003	0,005	-0,014	0,005	-0,006	-0,002	0,005	0,000
<b>Meldónio</b>	<b>0,003</b>	0,000	0,000	<u><b>1,019</b></u>	<u><b>1,016</b></u>	0,000	0,000	-0,002	<b>-0,002</b>	-
<b>Hidromorfona</b>	0,001	<b>-0,017</b>	<b>0,010</b>	<u><b>-0,027</b></u>	<b>-0,006</b>	<u><b>-0,025</b></u>	<b>0,007</b>	<b>-0,013</b>	<b>-0,010</b>	<b>0,023</b>
<b>Oximorfona</b>	0,001	<b>-0,017</b>	<b>0,012</b>	<b>-0,023</b>	<b>-0,004</b>	<b>-0,023</b>	0,001	<b>-0,013</b>	<b>-0,008</b>	<u><b>0,023</b></u>
<b>Prednisolona</b>	0,003	-0,001	-0,007	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	-0,002	0,000
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	0,002	0,000	0,000	-0,002	0,003	0,000	-0,003	-0,001	-0,002	0,004
<b>Prednisona</b>	0,003	-0,001	-0,007	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	-0,002	0,000

**Tabela 3.10:** Diferenças de tempos de retenção relativos,  $d(RRT)$ , entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente.

Analito	d(TRR)									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
<b>Higenamina</b>	0,004	0,003	<b>0,023</b>	<b>-0,040</b>	<b>-0,015</b>	<b>-0,039</b>	<b>-0,018</b>	<b>0,012</b>	<b>0,020</b>	-
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	0,000	-0,002	0,002	0,000	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	-
<b>4OH Tamoxifeno</b>	0,000	-0,004	0,002	-0,002	0,004	-0,002	0,004	0,000	0,004	0,002
<b>Clomifeno</b>	0,000	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,002	0,002	-0,002	0,000	0,000
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,002	-0,002	-0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	-0,002	0,000	-0,00
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,002	-0,002	-0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	-0,002	0,000	-0,002
<b>GW1516</b>	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	-0,002	0,002	-0,002	0,002	0,000
<b>Meldónio</b>	0,000	0,000	<b>0,002</b>	<b><u>1,021</u></b>	<b>1,019</b>	<b>0,002</b>	0,000	<b>-0,002</b>	<b>-0,002</b>	-
<b>Hidromorfona</b>	-0,002	<b>-0,006</b>	<b>0,013</b>	-0,002	<b>0,006</b>	-0,002	<b>-0,017</b>	<b>-0,013</b>	<b>-0,009</b>	<b>0,019</b>
<b>Oximorfona</b>	-0,002	-0,005	-0,005	-0,002	-0,000	-0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Prednisolona</b>	0,002	-0,005	-0,005	-0,002	0,000	-0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	-0,002	0,000	0,000	-0,001	0,002	0,001	-0,002	0,001	-0,001	0,004
<b>Prednisona</b>	-0,001	-0,005	-0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Os critérios de identificação estudados foram avaliados através da análise de 10 amostras fortificadas a dois níveis de concentração (MRPL e  $\frac{1}{2}$  MRPL) independentes das consideradas na modelação e monitorização do desempenho das identificações. Estas amostras foram analisadas em dias diferentes, i.e. em condições de precisão intermédia. A **Tabela 3.7** apresenta a percentagem de resultados positivos que não foram considerados como tal porque os parâmetros de identificação observados não foram aceites pelos critérios definidos. A taxa de sucesso dos critérios está dividida por tipo de critério (WADA ou STAT) e parâmetro de identificação ( $d(RRT)$  e  $d(AR)$ ).

**Tabela 3.11:** Taxa de insucesso da identificação de 10 amostras positivas considerando critérios estatísticos (STAT) e definidos pela WADA para os valores observados de  $d(RRT)$  e  $d(AR)$ .

Analito	d(TRR)		d(AR)	
	WADA (%)	Estatístico (%)	WADA (%)	Estatístico (%)
<b>Higenamina</b>	72	6	28	0
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	0	0	6	0
<b>4OH Tamoxifeno</b>	0	0	10	0
<b>Clomifeno</b>	0	0	0	0
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0	0	45	10
<b>GW1516 Sulfona</b>	0	0	0	0
<b>GW1516</b>	0	0	0	0
<b>Meldónio</b>	56	22	44	11
<b>Hidromorfona</b>	80	10	60	10
<b>Oximorfona</b>	75	5	5	0
<b>Prednisolona</b>	0	0	40	0
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	0	0	55	0
<b>Prednisona</b>	0	0	40	0

A **Tabela 3.7** comprova a elevada taxa de falso negativos de identificações baseadas nos critérios restritos definidos pela WADA.

A taxa de insucesso espectável dos critérios estatísticos é 5 % sendo inferior aos valores observados para alguns analitos. Esta divergência pode dever-se ao facto das amostras analisadas nesta verificação apresentarem interferentes “novos” considerando as urinas usadas para definir os critérios de identificação. Esta divergência resolve-se através do aumento do número de urinas usadas para definir os critérios estatísticos de identificação.

As divergências pontuais observadas entre as taxas de falso negativos observadas na **Tabela 3.7** e estimado por modelação de Monte Carlo podem também ser atribuídos ao número limitado de ensaios de controlo.





## Capítulo IV – Conclusão

---



No presente trabalho, avaliaram-se dois critérios de identificação da presença de substâncias dopantes em amostras biológicas, mais concretamente em amostras de urina, por LC-MS/MS. As identificações basearam-se na concordância de Tempos de Retenção Relativos, *RRT*, e Razões de Abundância de íons do espectro de massa, *AR*, observados num pico do cromograma da amostra e para o analito presente num “controlo positivo” de referência. Os critérios estudados neste trabalho foram o critério definido pela WADA ou obtido por modelação estatística dos parâmetros de identificação. A definição de critérios estatísticos e a avaliação do desempenho destes e dos critérios definidos pela WADA foram realizados numa folha de cálculo MS-Excel desenvolvida para este fim.

A folha de cálculo desenvolvida define os critérios de identificação estatísticos por simulações Monte Carlo de diferenças de *RRT* ou *AR* (i.e.  $d(RRT)$  e  $d(AR)$ ) em que cada *RRT* e *AR* envolve a simulação de tempos de retenção ou abundâncias correlacionadas. A distribuição destes parâmetros diverge frequentemente da normalidade o que não permite a utilização das ferramentas estatísticas que definem como pressuposto a normalidade dos dados.

A ferramenta computacional desenvolvida permitiu também estimar as taxas do Falsos Positivos (FP) e Falsos Negativos (FN) das identificações de analitos, a dois níveis de concentração, considerando critérios estatísticos e definidos pela WADA. Este estudo permitiu comprovar que os critérios estatísticos estão associados a FN constantes de 5 %, mas apresentam taxas elevadas de FP quando a determinação do composto é pouco sensível e seletiva. No caso dos critérios definidos pela WADA, as FP são muito baixas tendo como revés FN muito elevadas. Assim, pode-se concluir que os critérios da WADA são muito otimistas relativamente ao desempenho da identificação e os critérios estatísticos sugerem a necessidade de melhorar o desempenho de algumas determinações.

As FN estimada por modelação foram testadas através da análise de urinas fortificadas independentes das consideradas na modelação de  $d(RRT)$  e  $d(AR)$ . Nestas análises, observavam-se FN elevados sempre que se usam os critérios da WADA.

No entanto, a baixa taxa de FP das identificações realizadas com base nos critérios da WADA indicam que os positivos definidos por estes critérios têm uma elevada qualidade e baixa incerteza. Na maioria dos casos estudados, estas identificações produziram LR superiores a 106 que correspondem a evidências extremamente fortes da presença do analito.

Assim os critérios estatísticos de identificação podem ser utilizados para auxiliar a identificação de substâncias dopantes em amostras biológicas com o objetivo de identificar as situações onde se deve melhorar o desempenho analítico para reduzir a FN.

As hipóteses formuladas neste trabalho devem ser testadas com mais resultados de análise de urinas espaçadas no tempo para assegurar que o desempenho observado é representativo em termos de tipos de urinas e condições analíticas.



## Capítulo V – Bibliografía

---



- [1] A. A. d. Portugal, 2013. [Online]. Available: <http://www.adop.pt/>. [Acedido em 07 Fevereiro 2019].
- [2] C. Reardon e S. Creado , “Drugs abuse in athletes,” *Substance Abuse and Rehabilitation*, pp. 95-105, 2014.
- [3] O. Tavares, *Doping: Argumentos em discussão*, 1º ed., vol. 8, Portalegre: Movimento, 2002, pp. 41-45.
- [4] W. A.-d. Agency, “Internacional Standard for Laboratories,” 2016. [Online]. Available: <https://www.wada-WADA.org/en/resources/world-anti-doping-program/internacional-standard>. [Acedido em 30 Junho 2019].
- [5] w. a.-d. Agency, “Internacional Standard. What we do,” 2019. [Online]. Available: <http://www.wada-WADA.org/en/internacional-standards#testing>. [Acedido em 16 Fevereiro 2019].
- [6] W. A.-d. Agency, “Internacional Standard for Laboratories,” 2019. [Online]. Available: <http://www.wada-WADA.org/en/resources/world-anti-doping-program/internacional-standard>. [Acedido em 16 junho 2019].
- [7] W. A.-D. Agency, “Internacional Standard for the protection of privacy and personal information,” 2019. [Online]. Available: <http://www.wada-WADA.org/en/resources/data-protection/internacionalstandard-fot-the-protection-of-privacy-and-personal>. [Acedido em 16 junho 2019].
- [8] W. A.-d. Agency, “Internacional Standard for therapeutic Use Exemptions,” 2019. [Online]. Available:<http://www.wada-WADA.org/en/resources/therapeutic-useexemption/internacional-standard>. [Acedido em 16 junho 2019].
- [9] W. A.-D. Agency, “Internacional Standard for code Signatories,” 2019. [Online]. Available: <https://www.wada-WADA.org/en/what-we-do/the-code/code-signatories>. [Acedido em 11 julho 2019].
- [10] I. P. d. A. (IPAC), “Regulamento geral de acreditação (DRC001),” 2017. [Online]. Available: [http://www.ipac-pt/docs/publidocs/regulamentos/DRC001\\_RegulamentoGeral\\_V311217.pdf](http://www.ipac-pt/docs/publidocs/regulamentos/DRC001_RegulamentoGeral_V311217.pdf). [Acedido em 06 Junho 2019].
- [11] I. P. d. A. (IPAC), “Procedimento para acreditação de laboratórios,” 2018. [Online]. Available: [http://www.ipac-pt/docs/publidocs/regulamentos/DRC005\\_proAcrLabs\\_v20181231.pdf](http://www.ipac-pt/docs/publidocs/regulamentos/DRC005_proAcrLabs_v20181231.pdf). [Acedido em 06 Junho 2019].
- [12] I. P. d. A. (IPAC), “Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025,” 2018. [Online]. Available: [http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OGC001\\_GuiaAplicação17025\\_v20181231](http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OGC001_GuiaAplicação17025_v20181231). [Acedido em 30 Junho 2019].
- [13] I. P. d. A. (IPAC), “Guia para a acreditação de Laboratórios Químicos,” 2011. [Online]. Available: <http://www.ipac.pt/docs/publidocs/requisitos/OGC002.pdf>. [Acedido em 30 Junho 2019].
- [14] W. A.-D. Agency, “Urine Sample Collection Guidelines,” 2014. [Online]. Available: [http://www.wadWADA.org/sites/default/files/resources/files/wada\\_guidelines\\_urine\\_sample\\_collection\\_2014\\_v1.0\\_en.pdf](http://www.wadWADA.org/sites/default/files/resources/files/wada_guidelines_urine_sample_collection_2014_v1.0_en.pdf). [Acedido em 30 Junho 2019].
- [15] F. Carvalho e J. Duarte, “Toxicology Mechanism and Methods,” *Collection of biological samples in forensic Toxicology*, 2010.

- [16] D. Bordin e F. Monedeiro, "Scientia Chromatographica," 2º ed., vol. 7, 2015, pp. 125-143.
- [17] W. A.-D. Agency, "Technical Document: Laboratory documentation Packages," 2017. [Online]. Available: [http://www.wada-WADA.org/sites/default/files/resources/files/td2017doc\\_final\\_0.pdf](http://www.wada-WADA.org/sites/default/files/resources/files/td2017doc_final_0.pdf). [Acedido em 02 Julho 2019].
- [18] W. A.-D. Agency, "Technical Document: Decision limits for the confirmatory quantification of *threshold* substances," 2019. [Online]. Available: [http://www.wada-WADA.org/sites/default/files/td2019dl\\_final\\_eng\\_clean.pdf](http://www.wada-WADA.org/sites/default/files/td2019dl_final_eng_clean.pdf). [Acedido em 02 Julho 2019].
- [19] E. Hodgson, "A Textbook of the Modern Toxicology," vol. 3º, J. Wiley, Ed., New Jersey, 2004.
- [20] A. A. d. P. (ADOP), "Substâncias e Métodos proibidos em competição e fora de competição," 2019. [Online]. Available: <http://www.adop.pt/media/17584/Sum%C3%Alrio%20das%20principais%20altera%C3%A7%C3%B5es%20e%20notas%20explanat%C3%B3rias%20para%20202019%20-%20final%202.pdf>. [Acedido em 30 Junho 2019].
- [21] J. Domínguez, "Detección de substâncias dopantes e norina mediante cromatografia de líquidos/espectrometria de massa de tiempo de vuelo," p. 36, 2015.
- [22] L. Mendes Campos, "β2-agonistas de longa duração na doença pulmonar obstrutiva crónica," pp. 129-134, 2000.
- [23] M. Bettine, D. Monteriro e G. Gutierrez, "O Doping e os jogos Olímpicos: diferentes dimensões do fenómeno," p. 838, 2016.
- [24] W. A.-D. Agency, "Minimum Required Performance levels for detection and identification of *non-threshold* substances," *technical document- TD2019MRPL*, pp. 2-5, 2019.
- [25] W. A.-D. Agency, "Minimum criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes," *TD2015IDCR*, pp. 1-5, 2015.
- [26] D. Harris, "Quantitative Chemical Analysis," em *W.H Freeman and Company*, 6º ed., 2003, pp. 548-719.
- [27] H. David, "Modern Analytical Chemistry," em *McGraw-Hill Higher Education*, 1º ed., 2000, pp. 544-615.
- [28] C. Collins e G. Braga, "Fundamentos de cromatografia," *Unicamp*, pp. 273-397, 2006.
- [29] C. Dass, "In Fundamentals of contemporary mass spectrometry," *Basics of mass spectrometry*, pp. 1-14, 2006.
- [30] A. Priscila e J. Oliveira, "Diferentes técnicas de varredura de ions no espectrômetro de massa aplicadas à análise de organoclorados via GC/MS," Belo Horizonte, 2011.
- [31] J. Seeley e F. Kramp, *Journal of separation Science*, vol. 6º, p. 144, 2001.
- [32] R. Bettencourt da Silva, "Evaluation of trace analyte identification in complex matrices by low-resolution gas chromatography-mass spectrometry through signal simulation," pp. 553-567, 2016.
- [33] VIM - "Basic and general concepts and associated terms," 2012. [Online]. Available: [http://www.bimo.org/utills/common//documents/jcgm/JCGM\\_200\\_2012.pdf](http://www.bimo.org/utills/common//documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf). [Acedido em 27 Junho 2019].



- [34] Relacre, “Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química,” *Associação de laboratórios acreditados de Portugal*, 2000.
- [35] A. Silveira e L. Rogério, “Métodos quantitativos e qualitativos: um resgate teórico,” *Revista Interdisciplinar Científica Aplicada*, pp. 1-13, 2008.
- [36] Ricardo J. N. Bettencourt da Silva, Evaluation of trace analyte identification in complex matrices by low-resolution gas chromatography – mass spectrometry through signal simulation, *Talanta* 150 (2016) 553-567 (DOI 10.1016/j.talanta.2015.12.033)
- [37] José Narciso, Susana Luz, Ricardo J. N. Bettencourt da Silva, Assessment of the Quality of Doping Substances Identification in Urine by GC/MS/MS, *Analytical Chemistry* 91 (2019) 6638-6644 (DOI 10.1021/acs.analchem.9b00560)
- [38] Eurachem, “Quantificação da incerteza nas medições analíticas,” pp. 9-34, 2001.
- [39] I. P. d. A. (IPAC), “Avaliação da incerteza de medição em calibração,” 2015. [Online]. Available: <http://www.ipac.pt/docs/documentos.asp>. [Acedido em 07 Novembro 2018].
- [40] C. Gondim, R. Junqueira e S. Souza, Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos, 4<sup>o</sup> ed., Instituto Adolfo Lutz, 2011, pp. 433-437.
- [41] A. o. F. S. Providers, “Science and Justice,” vol. 49, p. 164, 2009.
- [42] H. Yoriyaz, “Método de Monte Carlo: Principios e Aplicações em física médica,” em *Monte Carlo*, 1<sup>o</sup> ed., 2009, pp. 141-149.
- [43] D. Gustavo e K. Andréa, Simulação de Monte Carlo na avaliação de incerteza de medição, 25/26 ed., vol. 13, revista Ciência e Tecnologia, 2005, pp. 5-15.
- [44] S. P e S. L, Aplicação da simulação de Monte Carlo no cálculo da incerteza de medição, 10<sup>o</sup> ed., Extensão em Ação, 2016, pp. 43-56.
- [46] Thierry Boghosian, Osquel Barroso, Victoria Ivanova & Olivier Rabin, *Ensuring high quality in anti-doping laboratories* vol.4 no.13 BIOANALYSIS
- [47] Lumilabo, 2009 (online) [lumilabo.pt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=68&Itemid=64](http://lumilabo.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=68&Itemid=64) [Acedido em 25 Setembro 2019].
- [48] Eurachem, “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement,” pp. 108-114, 2012.
- [49] *Anexo técnico – Condições Instrumentais da triagem IX por LC-MS/MS*. pp. 1-10, 2018. [Acedido em 26 Setembro 2019].



## Capítulo V – Anexos

---



## Anexo 1: Limites de aceitação

**Tabela 6.1:** Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL.

Analito	d(AR)		d(TRR)	
	Min	Máx	Min	Máx
<b>Higenamina</b>	0,050	0,071	-0,047	0,039
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	-0,041	0,170	-0,025	0,025
<b>4OH Tamoxifeno</b>	-0,023	0,316	-0,023	0,029
<b>Clomifeno</b>	0,007	0,367	-0,025	0,028
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,232	0,596	-0,027	0,028
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,108	0,151	-0,028	0,028
<b>GW1516</b>	0,080	0,110	-0,032	0,033
<b>Meldónio</b>	0,377	0,568	-0,005	0,005
<b>Hidromorfona</b>	0,633	0,781	-0,022	0,027
<b>Oximorfona</b>	0,534	0,631	-0,026	0,026
<b>Prednisolona</b>	0,678	1,014	-0,148	0,144
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	0,710	0,958	-0,119	0,100
<b>Prednisona</b>	0,541	0,685	-0,147	0,149

**Tabela 6.2:** Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL/2.

Analito	d(AR)		d(TRR)	
	Min	Máx	Min	Máx
<b>Higenamina</b>	0,046	0,093	-0,046	0,046
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	-0,031	0,223	-0,024	0,026
<b>4OH Tamoxifeno</b>	-0,151	0,508	-0,026	0,028
<b>Clomifeno</b>	-0,022	0,399	-0,026	0,028
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,188	0,679	-0,029	0,028
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,071	0,266	-0,030	0,030
<b>GW1516</b>	0,071	0,122	-0,035	0,034
<b>Meldónio</b>	0,324	0,587	-0,005	0,005
<b>Hidromorfona</b>	0,256	0,838	-0,023	0,024
<b>Oximorfona</b>	0,548	0,643	-0,026	0,023
<b>Prednisolona</b>	0,492	1,360	-0,128	0,088
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	0,614	1,124	-0,116	0,090
<b>Prednisona</b>	0,441	0,751	-0,143	0,129

## Anexo 2: Diferenças de razões de abundâncias e tempos de retenção relativos entre controlo e amostras analisadas

**Tabela 6.1:** Diferenças de razões de abundância de iões, d(AR), entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Os valores a negrito e a sublinhado encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente.

Analito	d(AR)									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
<b>Higenamina</b>	0,004	0,001	0,000	0,009	0,005	0,012	-0,005	-0,007	-0,008	-
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	0,024	-0,003	-0,003	0,019	0,033	-0,023	-0,002	-0,019	-0,015	-
<b>4OH Tamoxifeno</b>	-0,029	0,031	-0,005	0,032	0,013	0,007	0,026	0,005	-0,015	0,012
<b>Clomifeno</b>	0,006	0,019	-0,003	-0,017	-0,006	-0,013	-0,021	0,024	0,007	-0,010
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,067	<b>-0,088</b>	<b>-0,095</b>	<b>0,088</b>	-0,024	<b>-3,546</b>	-0,017	-0,009	0,016	<b>0,208</b>
<b>GW1516 Sulfona</b>	-0,004	0,008	0,016	-0,016	-0,003	0,014	0,002	-0,003	-0,020	-0,018
<b>GW1516</b>	-0,005	-0,000	-0,005	0,004	-0,001	-0,004	-0,004	-0,006	-0,002	-0,006
<b>Meldónio</b>	<b>-0,345</b>	<b>-0,315</b>	-0,058	0,052	<b>0,131</b>	<b>0,130</b>	-0,002	<b>-0,109</b>	-0,052	-
<b>Hidromorfona</b>	<b>-0,082</b>	-0,044	-0,049	-0,009	<b>-0,133</b>	<b>-0,092</b>	<b>0,099</b>	<b>-0,061</b>	-0,044	<b>-0,094</b>
<b>Oximorfona</b>	<b>0,062</b>	0,000	-0,027	0,021	0,028	-0,010	-0,031	0,022	0,004	-0,022
<b>Prednisolona</b>	-0,038	0,011	-0,002	0,012	<b>-0,118</b>	-0,031	0,000	-0,017	-0,001	0,005
<b>16α OH Prednisolona</b>	-0,005	0,006	-0,027	<b>0,074</b>	<b>-0,119</b>	<b>-0,051</b>	0,047	<b>0,071</b>	0,017	-0,043
<b>Prednisona</b>	<b>-0,089</b>	<b>-0,085</b>	-0,028	-0,034	<b>-0,109</b>	-0,024	0,020	0,027	-0,035	-0,024

**Tabela 6.2:** Diferenças de razões de abundância de iões, d(AR), entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL/2. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente.

Analito	d(AR)									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
Higenamina	<b>0,015</b>	0,002	<b>0,008</b>	<b>0,020</b>	<b>0,017</b>	<b>0,020</b>	-0,003	0,004	0,006	-
3OH 4Metoxi Tamoxifeno	0,065	-0,005	<b>0,148</b>	0,069	0,049	0,003	0,003	-0,019	-0,025	-
4OH Tamoxifeno	-0,019	0,026	0,048	0,079	0,022	-0,017	0,069	0,004	0,008	-0,024
Clomifeno	0,040	-0,006	-0,006	-0,002	0,010	-0,012	0,007	-0,009	0,008	-0,027
GW1516 Sulfoxido	<b>-0,089</b>	-0,025	-0,029	0,053	-0,013	<u><b>-3,723</b></u>	-0,038	<b>0,082</b>	0,018	<b>0,115</b>
GW1516 Sulfona	0,020	0,036	0,023	-0,002	-0,019	-0,006	0,007	0,001	-0,012	-0,007
GW1516	0,001	0,011	0,003	-0,003	-0,006	0,008	0,003	0,000	0,004	-0,006
Meldónio	<b>-0,227</b>	<b>-0,207</b>	-0,056	0,075	<b>0,165</b>	0,019	-0,037	-0,091	-0,096	-
Hidromorfona	0,013	<b>-0,183</b>	-0,015	<b>-0,076</b>	<b>-0,090</b>	<b>-0,062</b>	<b>0,102</b>	-0,010	<b>-0,075</b>	<b>-0,097</b>
Oximorfona	0,027	0,014	0,022	0,010	0,028	-0,033	-0,017	0,016	0,017	-0,012
Prednisolona	<b>-0,099</b>	<b>-0,077</b>	-0,033	<b>-0,054</b>	<b>-0,164</b>	<b>-0,097</b>	0,029	<b>-0,055</b>	-0,048	<b>-0,080</b>
16 $\alpha$ OH Prednisolona	<b>0,101</b>	<b>0,081</b>	<b>0,105</b>	<b>0,069</b>	<b>-0,120</b>	-0,036	<b>0,078</b>	-0,004	0,045	<b>-0,076</b>
Prednisona	<b>-0,055</b>	<b>0,066</b>	0,010	-0,011	<b>-0,076</b>	-0,043	<b>-0,099</b>	0,015	<b>-0,076</b>	-0,033



**Tabela 6.3:** Diferenças de tempos de retenção relativos, d(RRT), entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL/2. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação

Analito	d(TRR)									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
<b>Higenamina</b>	0,000	<b>0,012</b>	0,002	<u><b>-0,048</b></u>	<b>-0,033</b>	<b>-0,029</b>	-0,005	<b>0,010</b>	<b>-0,009</b>	-
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	0,007	0,000	-0,004	0,002	-0,009	-0,003	0,000	0,004	0,000	-
<b>4OH Tamoxifeno</b>	0,007	0,000	-0,004	0,001	-0,006	0,006	-0,001	-0,002	0,006	0,006
<b>Clomifeno</b>	0,006	0,000	-0,004	0,002	-0,009	0,002	-0,003	-0,002	0,004	0,000
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,008	0,002	-0,002	0,000	-0,010	0,006	-0,004	0,000	0,004	0,000
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,009	0,000	-0,004	0,004	-0,010	0,004	-0,009	-0,002	0,004	0,000
<b>GW1516</b>	0,010	0,000	-0,003	0,005	-0,014	0,005	-0,006	-0,002	0,005	0,000
<b>Meldónio</b>	<b>0,003</b>	0,000	0,000	<u><b>1,019</b></u>	<u><b>1,016</b></u>	0,000	0,000	-0,002	<b>-0,002</b>	-
<b>Hidromorfona</b>	0,001	<b>-0,017</b>	<b>0,010</b>	<u><b>-0,027</b></u>	<b>-0,006</b>	<u><b>-0,025</b></u>	<b>0,007</b>	<b>-0,013</b>	<b>-0,010</b>	<b>0,023</b>
<b>Oximorfona</b>	0,001	<b>-0,017</b>	<b>0,012</b>	<b>-0,023</b>	<b>-0,004</b>	<b>-0,023</b>	0,001	<b>-0,013</b>	<b>-0,008</b>	<u><b>0,023</b></u>
<b>Prednisolona</b>	0,003	-0,001	-0,007	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	-0,002	0,000
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	0,002	0,000	0,000	-0,002	0,003	0,000	-0,003	-0,001	-0,002	0,004
<b>Prednisona</b>	0,003	-0,001	-0,007	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	-0,002	0,000

**Tabela 6.4:** Diferenças de tempos de retenção relativos, d(RRT), entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Os valores a negrito e a sublinhados encontram-se fora dos limites de aceitação estatístico, para um nível de confiança de 95%, e da WADA, respetivamente.

Analito	d(TRR)									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
<b>Higenamina</b>	0,004	0,003	<b>0,023</b>	<b>-0,040</b>	<b>-0,015</b>	<b>-0,039</b>	<b>-0,018</b>	<b>0,012</b>	<b>0,020</b>	-
<b>3OH 4Metoxi Tamoxifeno</b>	0,000	-0,002	0,002	0,000	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	-
<b>4OH Tamoxifeno</b>	0,000	-0,004	0,002	-0,002	0,004	-0,002	0,004	0,000	0,004	0,002
<b>Clomifeno</b>	0,000	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,002	0,002	-0,002	0,000	0,000
<b>GW1516 Sulfoxido</b>	0,002	-0,002	-0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	-0,002	0,000	-0,00
<b>GW1516 Sulfona</b>	0,002	-0,002	-0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	-0,002	0,000	-0,002
<b>GW1516</b>	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	-0,002	0,002	-0,002	0,002	0,000
<b>Meldónio</b>	0,000	0,000	<b>0,002</b>	<b><u>1,021</u></b>	<b>1,019</b>	<b>0,002</b>	0,000	<b>-0,002</b>	<b>-0,002</b>	-
<b>Hidromorfona</b>	-0,002	<b>-0,006</b>	<b>0,013</b>	-0,002	<b>0,006</b>	-0,002	<b>-0,017</b>	<b>-0,013</b>	<b>-0,009</b>	<b>0,019</b>
<b>Oximorfona</b>	-0,002	-0,005	-0,005	-0,002	-0,000	-0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Prednisolona</b>	0,002	-0,005	-0,005	-0,002	0,000	-0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>16<math>\alpha</math> OH Prednisolona</b>	-0,002	0,000	0,000	-0,001	0,002	0,001	-0,002	0,001	-0,001	0,004
<b>Prednisona</b>	-0,001	-0,005	-0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000